



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

**PROTEÍNAS DE UNIÓN A HEPARINA EN ESPERMATOZOIDES
DE VERRACO Y SU RELACIÓN CON LA FECUNDIDAD**

Méd. Vet. Dora G. Dapino

Director: Dr. Marcelo O. Cabada

Codirectora: Dra. Patricia E. Marini

2010

A Piqui...

A Dolores y Manuel...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Marcelo Cabada por brindarme un lugar en su equipo de trabajo y así, permitirme dar mis primeros pasos firmes en el campo de la Investigación Científica.

Por sus palabras claras, sus recomendaciones y su experiencia.

Un agradecimiento especial para la Dra. Patricia Marini quien me ha acompañado y guiado todos estos años, siempre predispuesta y con tiempo para escucharme.

Por incluirme en sus proyectos, por confiar en mí.

A Juan Manuel Teijeiro, un compañero de trabajo excelente, dispuesto a colaborar y a quien agradezco su participación en algunos de los experimentos de este trabajo.

Un agradecimiento afectuoso al Dr. Alejandro Pidello por interesarse permanentemente en la evolución de mi trabajo, por sus elogios y sus consejos siempre oportunos.

Al Méd. Vet. Fernando Cane quien como profesional de la actividad privada, me brindó el espacio de discusión necesario para hacer mi pequeño aporte y vincularme al medio, y así, no perder la noción de que ese es el fin último de la Investigación Científica.

A los integrantes de mi Cátedra, con quienes compartí y deseo seguir compartiendo buenos momentos.

No quiero dejar de hacer partícipes de estas palabras de agradecimiento a José Ariel Ugalde, María Inés Oyarzábal y Rubén D'espósito. Cada uno, desde su lugar, ha sido importante en el desarrollo de esta tesis.

Parte de los resultados que se muestran en este trabajo de tesis han sido presentados previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** (2006). *Effect of heparin on in vitro capacitation of boar sperm*. Biological Research. 39 (4): 631-639.
- **Dapino Dora, Teijeiro Juan Manuel, Cabada Marcelo, Marini Patricia.** (2009). *Dynamics of heparin-binding proteins on boar sperm*. Animal Reproduction Science. 116: 308-317.

REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Fraccionamiento subcelular de espermatozoides de verraco para el estudio de componentes que unen heparina*. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias, UNR. Casilda, 6 de agosto de 2003.
- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Obtención de espermadhesinas del tipo HBP mediante fraccionamiento subcelular de espermatozoides de verraco*. XXIII Reunión Anual de la SBR. Rosario, 4 y 5 de diciembre de 2003.
- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cane Fernando, Cabada Marcelo.** *Dos alternativas de evaluación del estado acrosomal por efecto de la conservación en espermatozoides porcinos*. Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. Casilda, 6 de agosto de 2004.
- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Efecto de la adición de heparina en el medio de capacitación sobre la fisiología espermática en cerdos*. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas. SAIC. Mar del Plata, 16 al 20 de noviembre de 2004.
- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Rol de la heparina en el proceso de capacitación de espermatozoides de cerdo*. VI Congreso y XXIV Reunión Anual de la SBR. Rosario, 1 y 2 de diciembre de 2004.

- **Dapino Dora, Marini Patricia, Cane Fernando, Cabada Marcelo.** *Capacitación espermática en porcinos: rol de la heparina.* Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. Casilda, 5 de agosto de 2005.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Efecto de la heparina sobre la capacitación espermática en porcinos de acuerdo a la composición del medio de incubación.* XXV Reunión Anual de la SBR. Rosario, diciembre de 2005.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *El calcio y el bicarbonato son esenciales para la capacitación espermática mediada por heparina en porcinos.* Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. Casilda, 3 de agosto de 2006.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Efecto de la heparina sobre la capacitación espermática en porcinos.* X Reunión Latinoamericana de Cátedras de Fisiología Animal. República del Paraguay, 29 de noviembre y 1 de diciembre de 2006.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Localización de sitios de unión a heparina en la membrana del espermatozoide porcino.* VIII Congreso y XXVI Reunión Anual de la SBR año 2006.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Localización de sitios de unión a heparina en la membrana del espermatozoide porcino.* Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias, La Habana. Cuba. Abril de 2007.
- **Dapino Dora, Cane Fernando, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Dinámica y caracterización de los sitios de unión a heparina en la membrana del espermatozoide porcino.* Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. Casilda, 06 de agosto de 2007.
- **Dapino Dora, Teijeiro Juan Manuel, Marini Patricia, Cabada Marcelo.** *Modificación de los sitios de unión a heparina en espermatozoides de verraco por efecto de la capacitación.* IX Congreso y XXVII Reunión Anual de la SBR. Rosario, 29 y 30 de noviembre de 2007.
- **Dapino Dora, Teijeiro Juan Manuel, Cabada Marcelo, Marini Patricia.** *Fosforilación de proteínas durante la capacitación de espermatozoides porcinos: rol de la heparina.* Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Cs. Veterinarias. Casilda, 06 de agosto de 2008.

ABREVIATURAS

AMPc	adenosina monofosfato cíclico
BSA	albúmina sérica bovina
CTC	clortetraciclina
DAB	3,3-diaminobenzidina
DABCO	1-4-diaza-biciclo (2.2.2) octano
DE	desvío estándar.
EDTA	ácido etliendiaminotetracético
FC40	solución hipoosmótica de fructosa-citrato de sodio 40 Mosm/l
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSH	hormona folículoestimulante
GAG	glucosaminoglicanos
HBP:	“heparin binding protein”, proteínas de unión a heparina.
HOST	“hiposmotic swelling test”, test de resistencia osmótica.
KDa	kilo dalton
LH:	hormona luteinizante.
P/V	peso en volumen
PBS	amortiguador salino de fosfato
PMN	polimorfonucleares
PS	plasma seminal
PSA	aglitunina de <i>Pissum sativum</i>
RA	reacción acrosómica
SAT	solución amortiguadora de transferencia.

SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SDS	dodecil sulfato de sodio
TALP	tyrode's médium o medio de capacitación
TBS	amortiguador salino de TRIS
TRIS	N-tris-(hidroximetil)aminometano
TTBS	TBS con tween 20
UAI	unión ampolla-istmo
UUT	unión útero-tubal
V/V	volumen en volumen
ZO	zónula ocludens
ZP	zona pelúcida

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Células germinales primordiales y el sexo en los mamíferos	2
2. El desarrollo testicular durante la etapa fetal	4
3. Los testículos en el animal sexualmente maduro	4
4. Los túbulos seminíferos y la Barrera hematotesticular	5
4.1 Interacción entre las células de Sertoli: uniones estrechas	5
4.2 Interacción células de Sertoli-células germinales: uniones adherentes	8
5. El suceso más importante en el tubo seminífero: la espermatogénesis	10
5.1 La espermiogénesis	11
6. El espermatozoide	13
6.1 La cabeza del espermatozoide	13
6.2 El núcleo del espermatozoide	16
6.3 La cola o flagelo del espermatozoide	16
6.4 Dominios de membrana en el espermatozoide	19
7. El epidídimo	21
7.1 Maduración de los espermatozoides en el epidídimo	21
8. Glándulas sexuales accesorias del verraco	24
9. El plasma seminal	26
9.1 Las espermadhesinas del plasma seminal	27
10. Los espermatozoides en el tracto femenino	29
11. Capacitación	33

11.1 Importancia de los componentes del medio de incubación	34
11.2 La heparina como constituyente de los medios de capacitación	35
11.3 Rol de los mensajeros intracelulares en la capacitación:	
la fosforilación de proteínas espermáticas	37
11.3.1 La fosforilación en tirosina de proteínas espermáticas en	
la especie porcina: la p32	38
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Animales	41
2. Reactivos	41
3. Evaluación de la calidad seminal	41
3.1 Determinación de la concentración de espermatozoides	42
3.2 Evaluación de la motilidad espermática	42
3.3 Evaluación de la vitalidad o viabilidad espermática	43
3.4 Estimación de la morfología espermática	43
4. Procedimientos de tinción y técnicas microscópicas para la evaluación	
de la integridad estructural del acrosoma	44
4.1 Microscopía de contraste de fases	44
4.2 Tinción de Wells & Awa	44
4.3 Tinción Giemsa	45

4.4 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de evaluación de la integridad estructural del acrosoma	46
5. Evaluación del estado fisiológico de los espermatozoides mediante el uso de técnicas microscópicas	47
5.1 Medio de incubación	47
5.2Capacitación de los espermatozoides	47
5.3 Medición del estado de capacitación de los espermatozoides	48
5.3.1 Inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados con ionóforo de calcio A23187	48
5.3.2 Tinción con clortetraciclina (CTC)	49
6. Estudio del efecto de la heparina sobre la fisiología espermática	50
6.1 Incubación de espermatozoides porcinos en condiciones capacitantes en presencia o ausencia de heparina	50
6.2 Incubación de espermatozoides de cerdo en condiciones no capacitantes y en presencia o ausencia de heparina	50
6.3 Inducción de la reacción acrosómica con heparina	51
7. Análisis Estadístico de los datos correspondientes a los puntos 4 a 6	51
8. Estudios de proteínas	52
8.1 Determinación de la concentración de proteínas	52
8.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	52
8.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	53
8.4 Detección de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en presencia o ausencia de heparina	54

8.5 Detección de proteínas afines a heparina (HBP) en	
espermatozoides enteros y extractos de espermatozoides	55
8.5.1 Preparación de las muestras de espermatozoides enteros	55
8.5.2 Preparación de las muestras de extractos de espermatozoides	55
8.5.2.1 Obtención de membranas periacrosomales	55
8.5.2.2 Fraccionamiento subcelular	56
8.5.3 Biotinilación de la heparina	58
8.5.4 Tratamiento de las membranas para la detección de HBP	58
9. Evaluación de la unión de la heparina a la membrana plasmática del	
espermatozoide	59
9.1 Localización topográfica de los sitios de unión a heparina en la	
membrana espermática	59
9.2 Análisis de fecundidad y HBP	60
10. Detección de la unión de espermatozoides porcinos a zona pelúcida	
(ZP) homóloga en presencia de heparina	62
10.1 Preparación de los portaobjetos con ZP porcina solubilizada	62
10. 2 Detección de la unión de los espermatozoides a ZP solubilizada	63
11. Análisis estadístico de los datos correspondiente a los puntos 9 y 10	63
CAPÍTULO 1	65
<i>Estudios comparativos de métodos de detección de integridad acrosomal</i>	
<i>y capacitación</i>	65
1. INTRODUCCIÓN	65
2. RESULTADOS	69

2.1 Evaluación de la integridad estructural del acrosoma	69
2.2 Evaluación del estado fisiológico del espermatozoide	72
3. DISCUSIÓN	75
 CAPÍTULO 2	 79
<i>La heparina: su efecto sobre la fisiología del espermatozoide porcino</i>	79
1. INTRODUCCIÓN	79
2. RESULTADOS	82
2.1 Efecto de la concentración de heparina sobre los patrones de CTC en condiciones capacitantes	82
2.2 Efecto de la heparina sobre espermatozoides en condiciones capitantes y no capitantes	86
2.3 Efecto de la heparina sobre la Reacción Acrosómica	89
2.4 Efecto de la heparina sobre la fosforilación de proteínas	91
2.5 Efecto de la heparina sobre la interaccion espermatozoide-Zona pelucida	92
3. DISCUSIÓN	94
 CAPÍTULO 3	 101
<i>Distribución y dinámica de los sitios de unión a heparina en el espermatozoide porcino. ¿Un nuevo indicador de capacitación?</i>	101
1. INTRODUCCIÓN	101
2. RESULTADOS	103
2.1 Detección y caracterización de la unión de la heparina al	103

espermatozoide	
2.1.1 En espermatozoides sin tratar	103
2.1.2 En espermatozoides con diferente estado fisiológico (capacitados y reaccionados)	104
2.2 Localización de HBP en espermatozoides de cerdo por fraccionamiento subcelular	104
2.3 Localización de compuestos que unen heparina sobre el espermatozoide	107
2.4 Las HBP como indicadoras de fecundidad en la especie porcina	112
3. DISCUSIÓN	115
RESUMEN	121
CONCLUSIONES GENERALES	128
BIBLIOGRAFÍA	131

INTRODUCCIÓN GENERAL

El estudio de la fisiología espermática es de vital interés para la comprensión integral del proceso de fecundación y la identificación de posibles alteraciones del mismo. El espermatozoide es una célula altamente diferenciada que evoluciona a partir de una célula pluripotente, la *espermatogonia tipo A indiferenciada* hasta constituirse, durante la pubertad masculina, en un tipo celular capaz de interactuar con el ovocito y así dar origen a un nuevo individuo. En el transcurso de esta evolución, la célula espermática experimenta múltiples modificaciones como resultado de su transporte a través de ambientes diversos tanto en el tracto reproductivo masculino como en el femenino. El conocimiento de estas modificaciones es una herramienta necesaria para el desarrollo de la investigación básica y de nuevas tecnologías. En el primer caso, para la construcción de nuevos modelos que aporten al conocimiento de la especie en estudio y eventualmente sean generalizables y, en el segundo caso, como herramienta para mejorar la eficiencia reproductiva, identificar posibles causas de infertilidad y así otorgar mayor valor predictivo a los análisis de calidad seminal en cuanto a su capacidad de reflejar el potencial fecundante de un individuo.

Este trabajo de tesis pretende profundizar en los aspectos relacionados con la fisiología del espermatozoide de cerdo (*Sus scrofa*) durante el proceso de capacitación.

1. Células germinales primordiales y el sexo en los mamíferos

En muchos animales, incluidos algunos vertebrados, los ovocitos no fecundados son asimétricos, con regiones del citoplasma conteniendo diversos sets de ARNm y proteínas. Cuando el ovocito es fecundado, las células del embrión temprano heredan moléculas específicas del citoplasma y algunas se transforman en células germinales primordiales (CGPs). En los mamíferos, en cambio, el ovocito es simétrico y las células producidas por las primeras divisiones son todas totipotentes. Un pequeño grupo de estas células en el epiblasto del embrión temprano se transforma, por señales de las células vecinas, en CGPs que migran luego, a través de la invaginación del intestino posterior, hacia la cresta genital, el sitio de la gónada en desarrollo (Figura 1) (Alberts y col, 1994; Sutton, 2000).

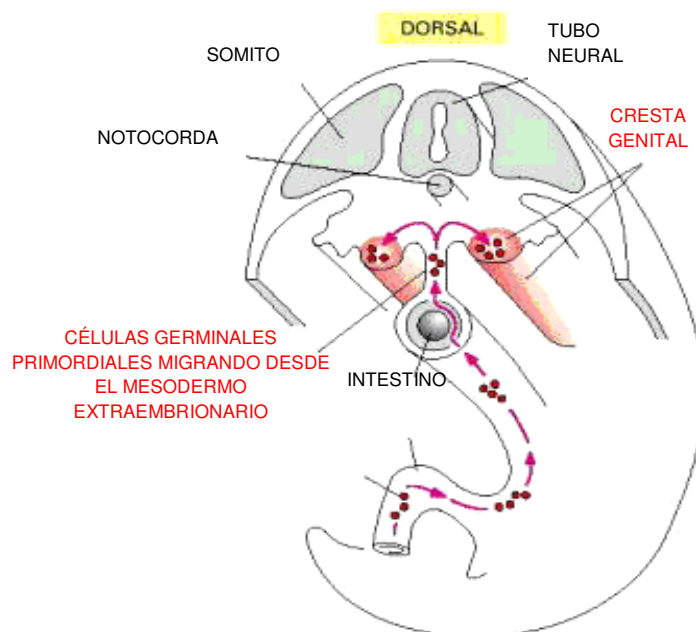


Figura 1. **Migración de las células germinales primordiales en mamíferos.** Adaptado de Alberts y col., 1994.

En este momento, las CGPs entran en arresto mitótico comprometiéndose a una única vía de desarrollo: *ovocito o espermatozoide*; dependiendo del tipo de cromosoma sexual de la cresta genital (Sutton, 2000).

El sexo de los mamíferos es determinado por sus cromosomas sexuales. Los mamíferos femeninos tienen 2 cromosomas X mientras que los machos tienen un X y un Y. El cromosoma Y es el factor determinante y actúa en las células somáticas de la cresta genital induciéndolas a desarrollarse en testículos en lugar de ovarios. Un gen crucial de este cromosoma Y tiene la función *determinante de testículo Sry (región determinante del sexo del cromosoma Y)* que dirige la diferenciación de la gónada temprana bipotencial a testículo (Koopman y col., 1991; Sutton, 2000; Wilhelm y col., 2007). Este gen sólo se expresa en un subgrupo de células somáticas de la gónada en desarrollo que se diferenciarán en *células de Sertoli*, el principal tipo celular de soporte del testículo.

La diferenciación sexual de la gónada masculina en testículos comienza en el día 26 de gestación en el cerdo (Pelliniemi, 1975; Waites y col., 1985) y es el túbulo seminífero el que dirige las etapas finales de la diferenciación de las CGPs en el feto macho: la formación de las *células madre espermatogénicas* (CME) o espermatogonia tipo A indiferenciada que generará células germinales diferenciadas en la etapa adulta (Meachem y col., 2001).

2. El desarrollo testicular durante la etapa fetal

Durante la etapa fetal, se produce la multiplicación de las células de Sértoli primitivas y las células germinales primordiales. Estas últimas se organizan en grupos celulares ubicándose en recesos que les proveen las células de Sértoli. El número de células de Sértoli fetales aumenta hasta poco antes del nacimiento; luego, su capacidad proliferativa decrece produciéndose una población estable. Esta intensa actividad mitótica está gobernada principalmente por hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) (Walker y Cheng, 2005) y el Factor de célula madre o Stem cell factor (SCF) y su receptor c-kit (Rossi y col., 1993; Krester y Kerr, 1994; Allard y col., 1996; O'Donnel y col., 2001).

El establecimiento de un adecuado número de células de Sértoli durante la fase proliferativa fetal y neonatal terminará el potencial espermatogénico del testículo de ese individuo (De Rooij y Russel, 2000; Meachem y col., 2000).

3. Los testículos en el animal sexualmente maduro

Los *testículos*, están situados por fuera del abdomen, dentro del *escroto*, que es una estructura sacular derivada de la piel. Cada testículo descansa dentro de una estructura en forma de vaina que proviene del peritoneo abdominal y está constituida por una *túnica parietal* que contacta con el escroto y una *túnica visceral* que contacta con el testículo y el epidídimo. Por debajo de esta túnica vaginal, se encuentra la *túnica albugínea* que penetra en el parénquima del

órgano y lo divide en lóbulos que contienen a los *túbulos seminíferos*, la unidad funcional del testículo (Figura 2).

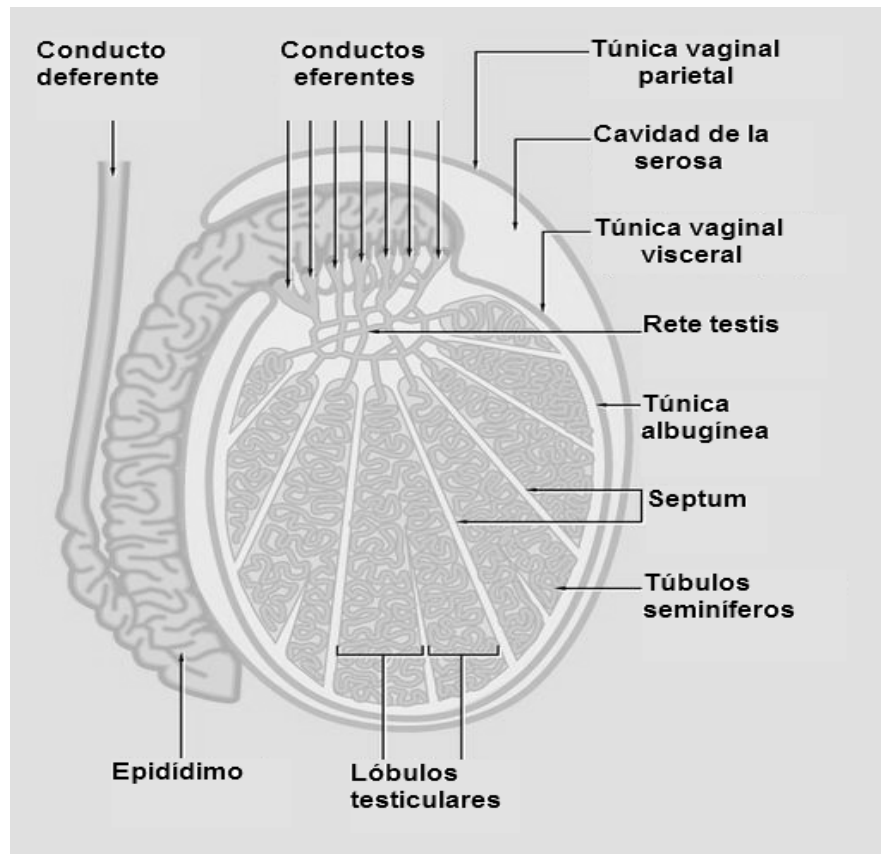


Figura 2: **Dibujo esquemático del testículo y el epidídimo.** Se muestran las principales estructuras y el sistema tubular. Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

4. Los túbulos seminíferos y la Barrera hematotesticular.

4.1 Interacción entre las células de Sertoli: uniones estrechas

El epitelio del túbulo seminífero está formado por 2 tipos celulares básicos: las *células de Sertoli* y las *células germinales en desarrollo*, protegidas contra los cambios químicos en la sangre por medio de una barrera de permeabilidad

especializada: la barrera *hematotesticular* (BHT) formada por las uniones estrechas entre células de Sertoli adyacentes (Setchel, 1980; Garner y Hafez, 1990) (Figura 3).

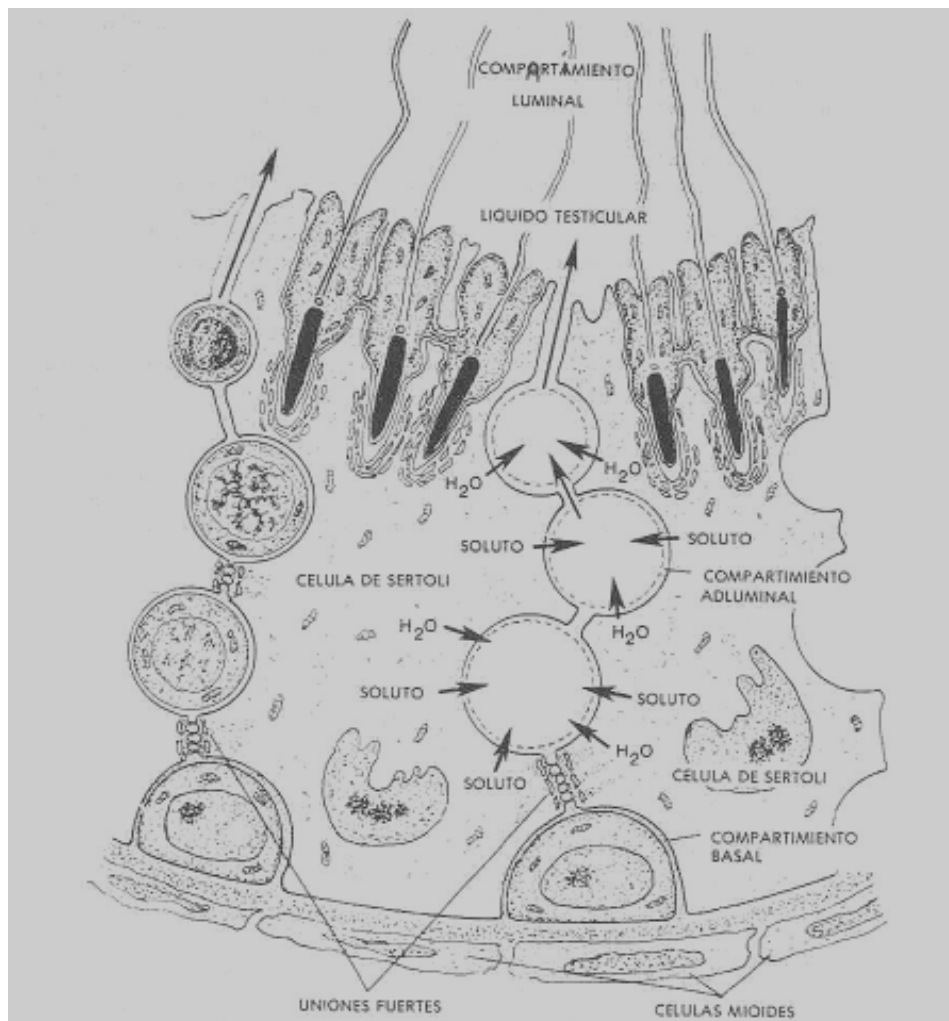


Figura 3: **La barrera hematotesticular.** Las uniones estrechas entre las células de Sertoli forman la principal barrera de permeabilidad entre la sangre y los testículos. El compartimiento basal está ocupado por espermatogonias y espermatocitos primarios, el adluminal contiene las etapas más avanzadas de espermatocitos y espermatídes y se comunica con la luz de los túbulos. Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

Esta barrera divide a los túbulos seminíferos en compartimientos basal y adluminal. El basal contiene espermatogonias y espermatocitos preleptotene y el adluminal los estadios más avanzados de los espermatocitos y espermátides y comunica libremente con la luz del túbulo (Figura 3).

Las funciones de las uniones estrechas en todos los epitelios son crear una barrera que restringe la difusión de solutos a la vía paracelular (Mitic y Anderson, 1998), establecer dominios de membrana diferentes (Rodriguez-Boulan y Nelson, 1989) y constituir una barrera inmunológica evitando la entrada de inmunoglobulinas y linfocitos al compartimiento adluminal (Setchel, 1980).

En el testículo, estas uniones se forman en la pubertad (Cheng y Mruk, 2002), a las 16 a 20 semanas en el cerdo (Sanchez y Von Lawzewitsch, 1984) y la barrera puede abrirse o cerrarse y permitir la progresión de las células hacia el compartimiento adluminal (Cheng y Mruk, 2002). Dicha progresión parece regularse por ciertos cambios moleculares como la *fosforilación en tirosina* de las proteínas asociadas a la unión (claudina, ocludina y zónula ocludens), la participación de *GTPasas* en la reorganización del citoesqueleto y del *AMPc* en el ensamblaje y mantenimiento de la unión; y la regulación mediante *proteasas*, e *inhibidores de proteasas* (Cheng y Mruk, 2002) (Figura 4).

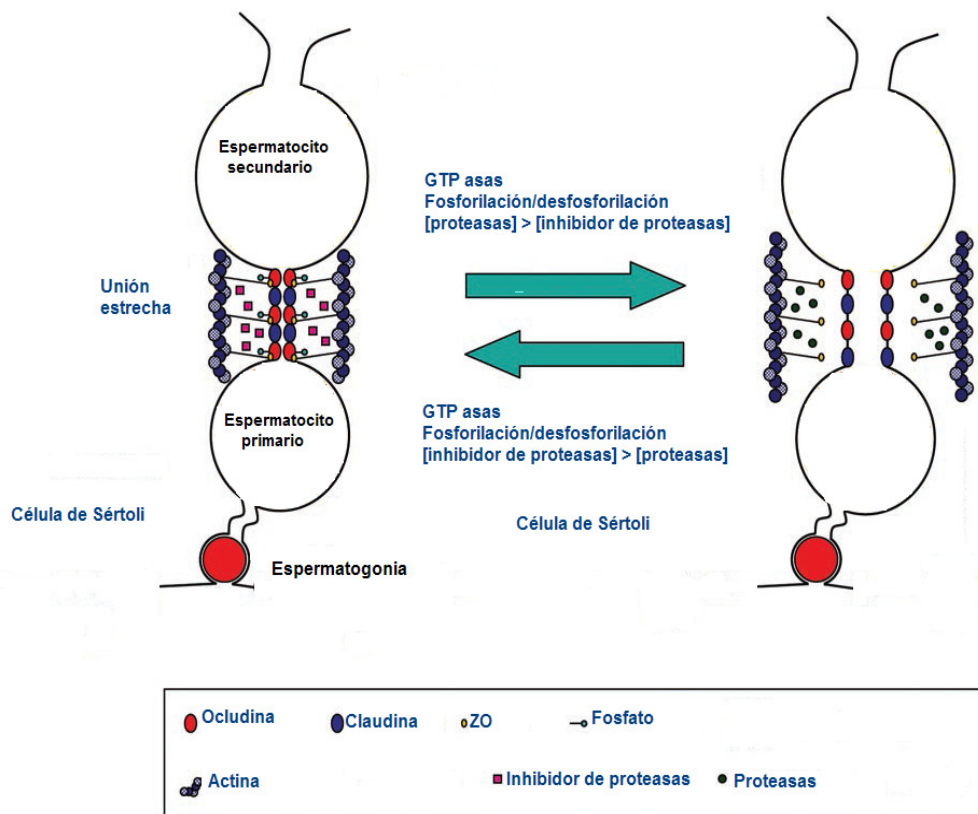
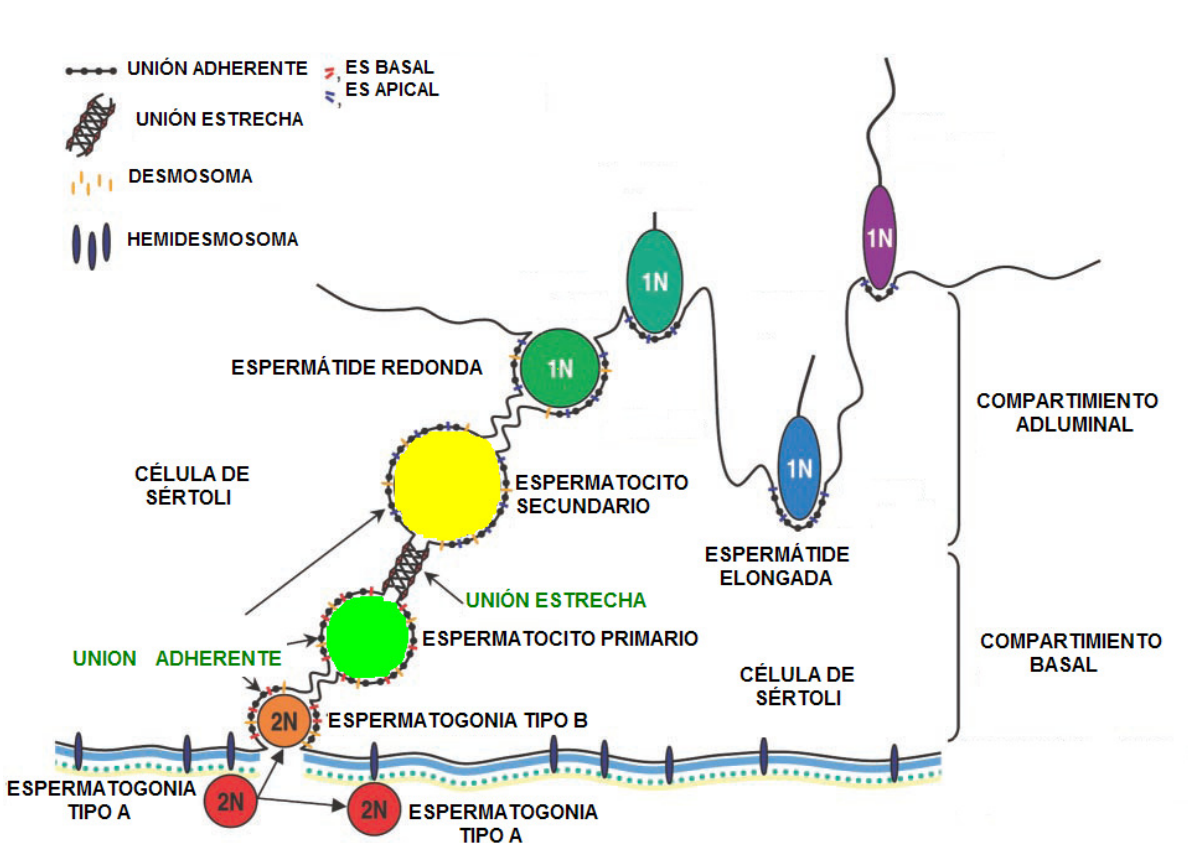


Figura 4. **Modelo molecular de la dinámica de las uniones estrechas entre células de Sertoli.** Izquierda: Unión estrecha cerrada. Derecha: unión estrecha abierta. En el testículo, la dinámica de estas uniones es regulada por diferentes moléculas y/o el estado funcional de las proteínas, como GTPasas, proteasas/inhibidores de proteasas, fosforilación de proteínas, AMPc. Por ejemplo, la desfosforilación de la ocludina hace que ésta se mueva hacia la región basolateral de la membrana, interrumpiendo la unión estrecha (panel de la derecha). Del mismo modo, un incremento de proteasas favorece la interrupción de la unión estrecha (panel de la derecha) pero un incremento del inhibidor de proteasas favorece el cierre de la barrera (panel de la izquierda). Adaptado de: Cheng y Mruk, 2002.

4.2 Interacción células de Sertoli - células germinales: uniones adherentes

Las células germinales y las de Sertoli desarrollaron una íntima red de comunicación célula-célula, tal que las células de Sertoli pueden proveer a las células germinales de los nutrientes y factores biológicos necesarios. Durante la



unión (Brown y Cooper, 1996; Wine y Chapin; 1999; Anastasiadis y Reynolds, 2000).

5. El suceso más importante en el túbulo seminífero: la espermatogénesis

Se define a la espermatogénesis como una serie de eventos citológicos que resultan en la formación de un espermatozoide maduro (Sharpe, 1994).

La espermatogénesis es esencialmente similar en todos los mamíferos y puede ser dividida en fases de desarrollo a través de las cuales todas las células germinales pasan en forma secuencial a través del tiempo (Figura 6).

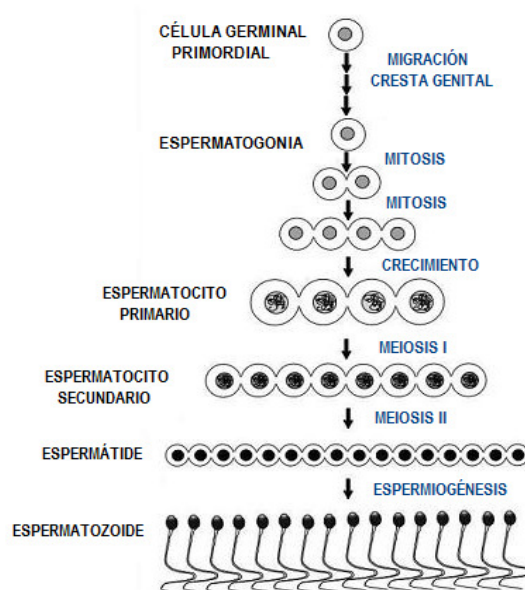


Figura 6: **Secuencia de eventos durante la espermatogénesis.** Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

La fase inicial es la *proliferativa o fase de espermatogonia* en donde se determina la cantidad de espermatozoides que cada especie produce. Una división inicial de la célula madre espermatogonia A0 da origen a 2 células hijas una de las cuales inicia el proceso de espermatogénesis y la otra permanece como célula madre. Luego de una serie de divisiones mitóticas, se forma la espermatogonia B, cuyas células hijas iniciarán una prolongada fase meiótica como espermatocitos preleptotene, incluidos dentro del compartimiento adluminal del túbulo seminífero. Todas las células germinales meióticas y postmeióticas restantes residirán en el compartimiento adluminal y serán dependientes de las células de Sertoli para la provisión de todos sus requerimientos.

La fase meiótica incluye la síntesis de ADN en el espermatocito preleptotene, síntesis de ARN en el espermatocito paquitene y la finalización de la meiosis con una división reduccional y una división mitótica tal que, teóricamente, cada espermatocito paquitene da origen a 4 espermátides haploides (Figura 5).

5.1 La espermiogénesis

La espermiogénesis es la transformación de las espermátides redondas en espermatozoides, células diferentes a cualquier otra célula del cuerpo, formada por una cabeza compacta con ADN nuclear inactivo; un acrosoma con enzimas que le permiten penetrar las envolturas del ovocito; y una cola o flagelo con abundantes mitocondrias que aportan energía para su movilidad. La casi ausencia de citoplasma y organelas (Eddy y O'Brien, 1994; Yanagimachi y col., 1994),

hacen que el espermatozoide maduro pierda su potencial para la expresión génica (Boerke y col., 2007).

El proceso de espermiogénesis puede dividirse en 3 etapas principales. La primera corresponde al desarrollo acrosomal, la segunda etapa incluye dos eventos importantes, la elongación de la espermatide y la condensación nuclear y la tercera corresponde a la espermiación. Durante la condensación nuclear, las histonas que componen la cromatina nuclear son reemplazadas por proteínas de transición y luego por protaminas. Así, convierte la organización del tipo nucleosoma de la cromatina en fibras de cromatina compactas que pueden ser empaquetadas en arreglos paralelos (condensadas). El resultado de esto es la conversión de un núcleo transcripcionalmente activo en inactivo, rasgo característico del espermatozoide (Govin y col., 2004).

El período de elongación de las espermatides se caracteriza por la elongación del flagelo, la acumulación de las mitocondrias asociadas y la reducción progresiva del volumen citoplasmático acompañado de la eliminación de agua, al momento de desprenderse de la célula de Sertoli. Este citoplasma se denomina cuerpo residual y es fagocitado por la célula de Sertoli y llevado hasta su porción basal, en donde sufre degradación lisosomal (Cheng y Mruk, 2002). Habiéndose liberado de su citoplasma residual, la espermatide se desprende de la célula de Sertoli y se transforma en espermatozoide (Figura 6).

6. El espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente diferenciada en estructura y función y al mismo tiempo totipotente desde el punto de vista del desarrollo, siendo capaz de combinarse con otra célula (el ovocito) y así dar origen a un nuevo individuo (Eddy y O'Brien, 1994). Sus componentes principales son la *cabeza* y la *cola* que se unen en el cuello (Figura 7).

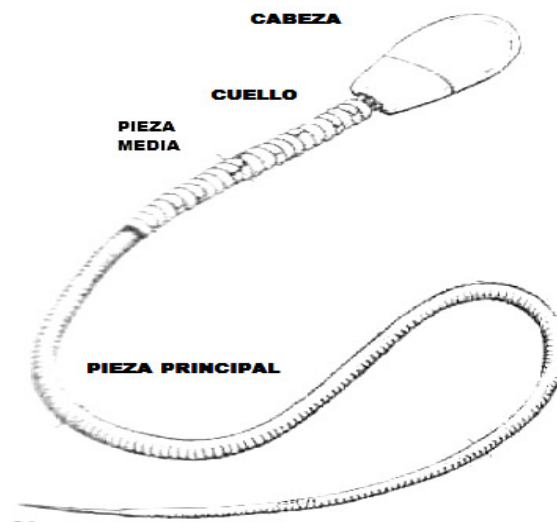


Figura 7: Componentes principales del espermatozoide de mamífero. Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

6.1 La cabeza del espermatozoide

La cabeza consiste en un acrosoma, el núcleo y una pequeña cantidad de citoesqueleto y citoplasma (Figura 8).

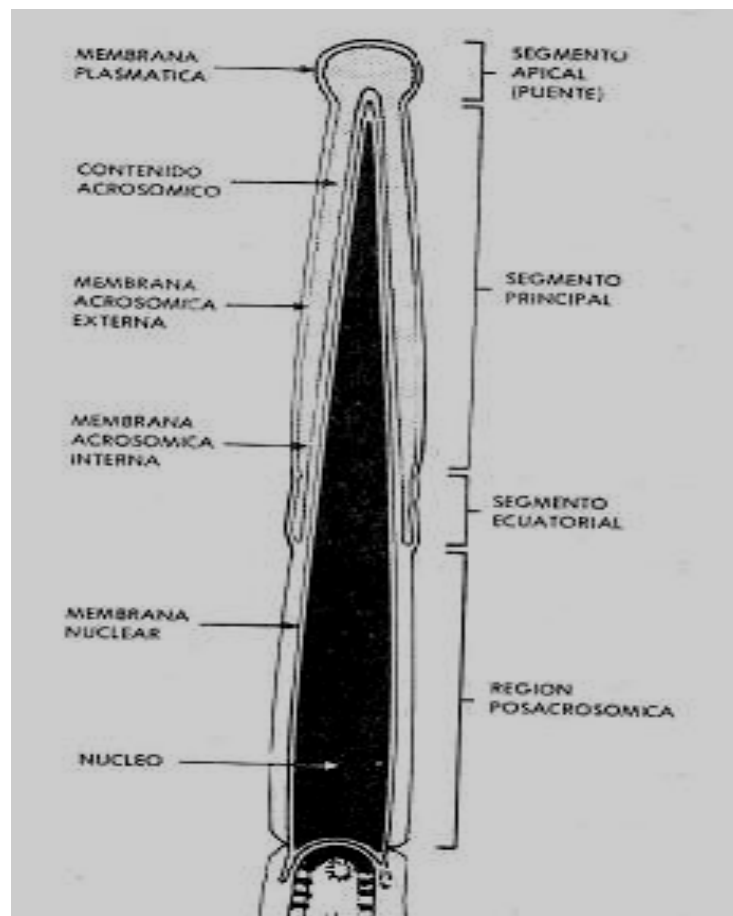


Figura 8: **Corte transversal de la cabeza de un espermatozoide de mamífero.** El acrosoma incluye el segmento superior o apical y los segmentos principal y ecuatorial. Las membranas externas de los segmentos apical y principal constituyen el capuchón acrosómico. También se muestra la relación del acrosoma (provisto de membranas externa e interna) con las membranas nuclear y plasmática. Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

El *acrosoma* es una vesícula que se origina a partir del complejo de Golgi en la espermátide, contiene las enzimas necesarias para la penetración de las envolturas del ovocito y se ubica como un capuchón en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide.

La membrana acrosomal interna cubre la porción anterior de la membrana externa del núcleo y se continúa con la membrana acrosomal externa que se encuentra por debajo de la membrana plasmática (Figura 8).

El acrosoma contiene múltiples enzimas, incluidas varias hidrolasas ácidas comúnmente presentes en los lisosomas y otras enzimas específicas de las células espermatozoides. Si bien en ocasiones ha sido descrito como un lisosoma especializado (Allison y Hartree, 1970), hoy se sabe que presenta las características de una vesícula secretoria regulada, ya que durante la reacción acrosómica, su contenido es liberado por una exocitosis mediada por calcio (Eddy y O'Brien, 1994).

El constituyente mejor caracterizado del contenido acrosomal es la *acrosina*, un miembro de la superfamilia de serin proteasas exclusivo de las células espermatozoides. Las secuencias de aminoácidos de acrosinas deducidas a partir de ANDcs de muchas especies, incluido el cerdo (Baba y col., 1989), indican que contienen 2 dominios (I y II) con marcada homología con las demás serin proteasas y un carboxilo terminal (dominio III) que es único dentro de la superfamilia y es la porción que se pierde en el momento en que la proacrosina se convierte en la enzima activa durante la reacción acrosómica. Estudios de inmunolocalización han revelado que esta enzima se encuentra principalmente en la porción anterior del acrosoma y en la membrana acrosomal interna en humano, cerdo, toro y conejo (Garner y Easton, 1977).

Otros componentes acrosomales son, la *acrosinina*, una proteína de 32.000 daltons que parece regular la secuencia de activación de la proacrosina en

cerdos, la *hialuronidasa* relacionada con la hidrólisis de las uniones entre las células del cúmulo del ovocito, la β -*galactosidasa*, *neuraminidasas*, *fosfolipasa A2*, *fosfolipasa C*, *arilsulfatasa A*, entre otras (Eddy y O'Brien, 1994).

6.2 El núcleo del espermatozoide

El núcleo del espermatozoide contiene una cromatina altamente condensada (tal como se explica en la sección correspondiente a “espermiogénesis”) y su tamaño es significativamente menor que el de las células somáticas. Además, las dos divisiones meióticas que ocurren durante la espermatogénesis determinan que cada espermatozoide contenga sólo una copia de cada cromosoma (haploidía).

6.3 La cola o flagelo del espermatozoide

El flagelo está constituido por un *axonema central* rodeado por *fibras densas externas* que se extienden desde la cabeza hasta cerca del final del flagelo. La porción anterior del flagelo contiene mitocondrias rodeando en forma de hélice a las fibras densas externas formando la *vaina mitocondrial*, y la porción posterior está constituida por una *vaina fibrosa* que rodea a dichas fibras densas (Figura 9).

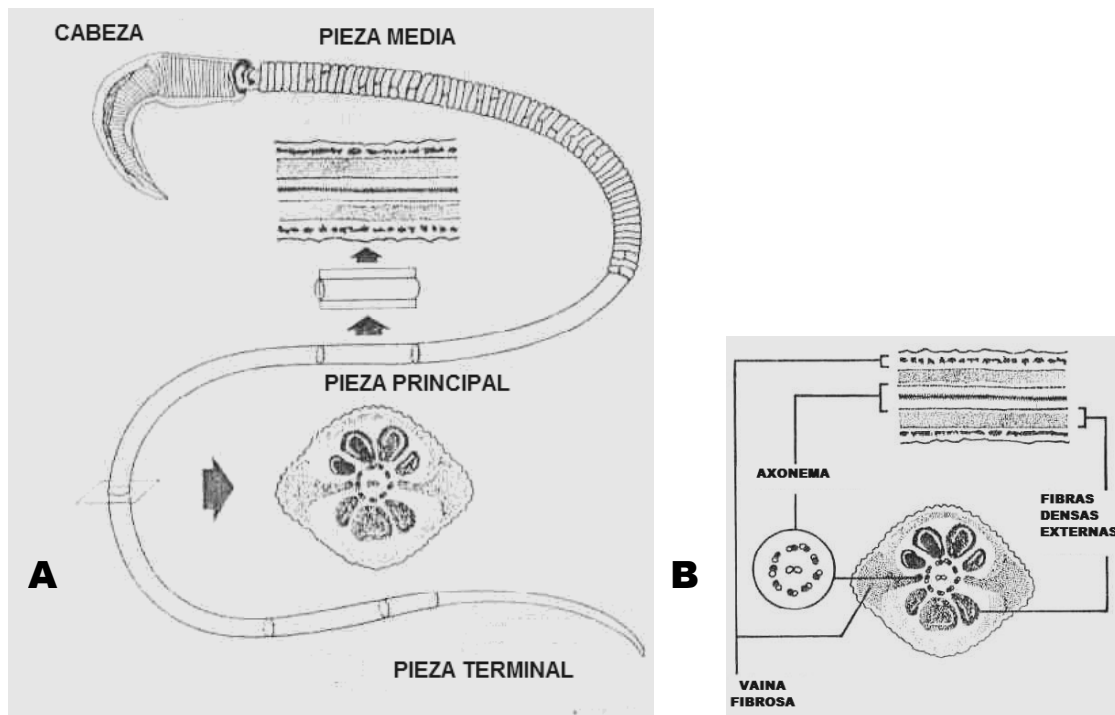


Figura 9: **Características principales del flagelo en espermatozoide de mamífero.** (A) El flagelo se inicia en la pieza de conexión y se continúa con las piezas media y principal. La pieza media contiene la vaina mitocondrial y la principal, la vaina fibrosa. Las secciones longitudinales y transversales de ambas regiones se señalan con flechas. (B) Componentes del flagelo. El axonema va desde la pieza de conexión hasta la porción distal y en la pieza principal, está rodeado por la vaina fibrosa. Las fibras externas gruesas se extienden desde la pieza de conexión hasta la región posterior de la pieza principal. Éstos se encuentran entre la vaina mitocondrial y el axonema en la región de la pieza media y entre la vaina fibrosa y el axonema en la pieza principal. Adaptado de Eddy y O'Brien, 1994.

Todos los espermatozoides de mamíferos presentan estas características generales, aunque existen diferencias entre especies en cuanto a la forma y tamaño de la cabeza y el tamaño relativo de los componentes del flagelo (Figuras 10 y 11).

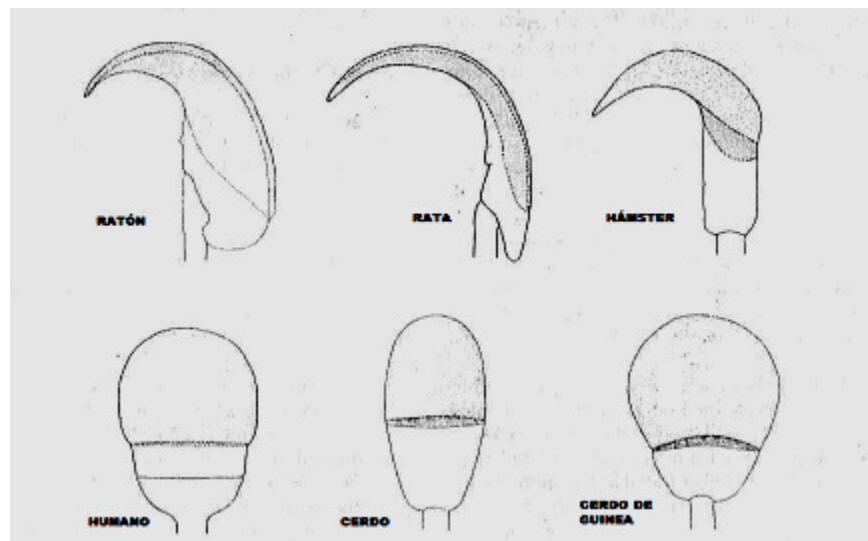


Figura 10: **La forma de la cabeza de espermatozoides de diferentes especies.** El ratón, la rata y el hámster presentan una cabeza falciforme, mientras que en humanos, cerdos y cerdo de guinea, la cabeza es de tipo espatulada. Adaptado de Eddy y O'Brien, 1994.

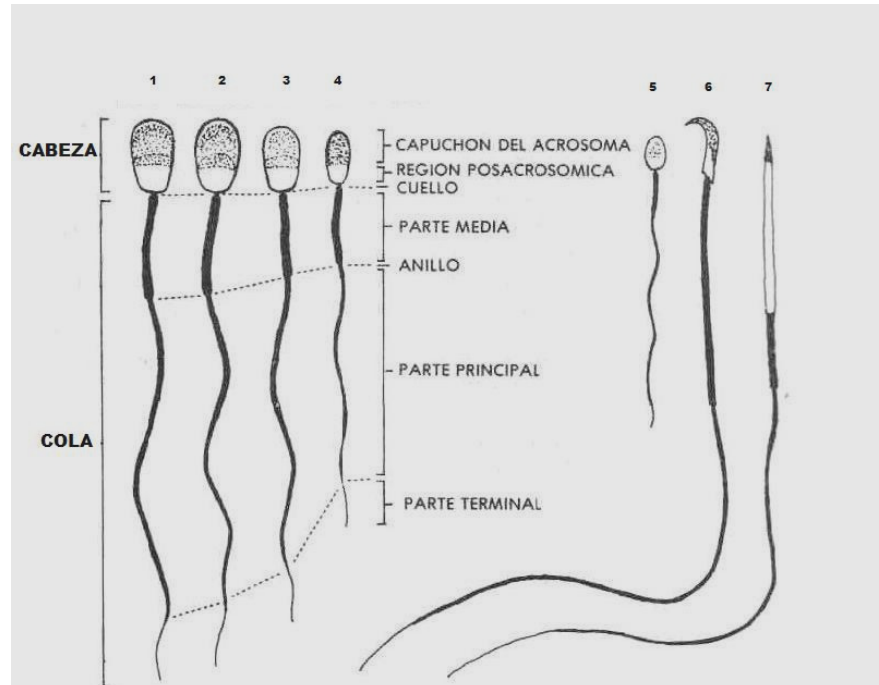


Figura 11: **Espermatozoides de animales de granja y otros vertebrados.** Se observan los principales componentes estructurales y las diferencias en tamaño relativo y forma. 1. Toro, 2. Verraco, 3. Carnero, 4. Garañón, 5. Humano, 6. Rata, 7. Gallo. Adaptado de Garner y Hafez, 1990.

La gran especialización de los espermatozoides es el reflejo de sus actividades funcionales únicas. El acrosoma contiene enzimas esenciales para la fecundación y el flagelo la fuente de energía y la maquinaria necesaria para la motilidad. El único rol de estos componentes es asegurar el transporte del material genético hasta el ovocito, donde ocurre la combinación de los pronúcleos masculino y femenino y la formación del cigoto.

6.4 Dominios de membrana en el espermatozoide

Una característica destacable del espermatozoide es que su membrana plasmática está subdividida en diversos dominios claramente identificables y diferentes en su composición y función (Figuras 12 y 13).

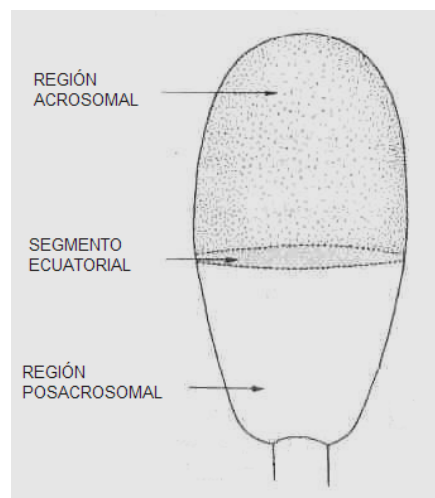


Figura12: **Dominios de la membrana plasmática en espermatozoides de mamífero.** Los principales dominios de la cabeza son la región acrosomal y la región posacrosomal separadas por el segmento ecuatorial. Adaptado de Eddy y O'Brien, 1994.

Los dominios de la cabeza del espermatozoide son las regiones acrosomal y posacrosomal (Figura 12). A su vez, ambos dominios están divididos en subdominios como los describen Gadella y col., 1995, estableciendo su topología y nomenclatura en espermatozoides porcinos (Figura13).

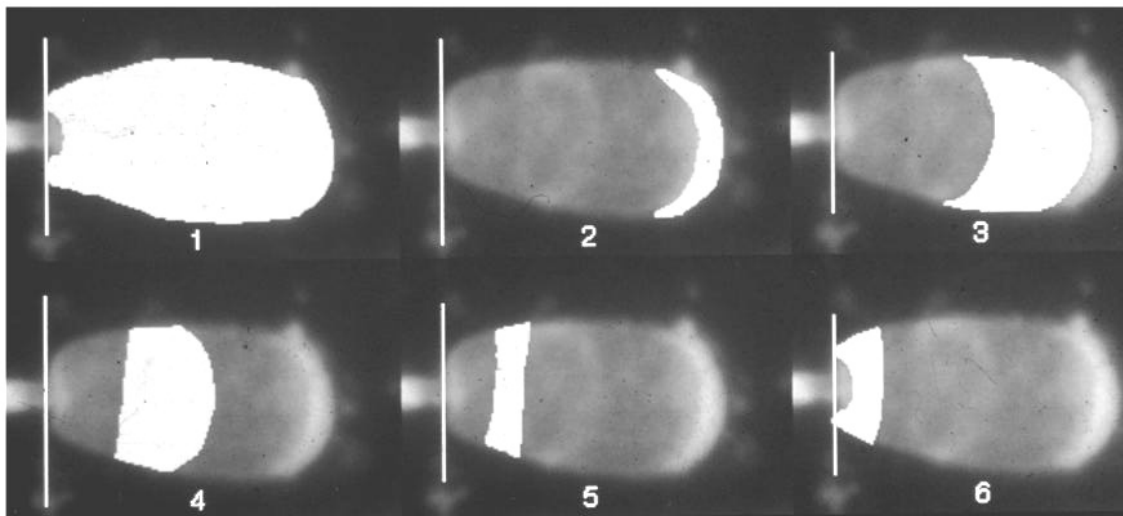


Fig. 13. Nomenclatura y morfología de los subdominios de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide porcino. Las áreas blancas indican: (1) la cabeza completa, (2) el subdominio apical, (3) el subdominio pre-ecuatorial, (4) el subdominio ecuatorial, (5) el subdominio ecuatorial distal y (6) el subdominio postacrosomal. Adaptado de Gadella y col., 1995.

Los dominios de membrana en el flagelo incluyen la *pieza media* que rodea la vaina mitocondrial y la cola posterior o *pieza principal*.

Todos estos dominios son dinámicos y sufren cambios en su organización y composición durante el proceso de maduración celular, incluida la maduración epididimal y la capacitación en el tracto femenino (Jones y col., 2007; Gadella y col., 2008)

7. El epidídimo

7.1 Maduración de los espermatozoides en el epidídimo

Los espermatozoides que abandonan el testículo no tienen aún la capacidad de fecundar al ovocito, característica que adquieren mientras experimentan un lento pasaje a través del epidídimo, proceso denominado “Maduración epididimaria”. El epidídimo es un órgano tubular íntimamente asociado al testículo y constituido por tres regiones principales claramente identificables, una *cabeza* y un *cuerpo* en donde se desarrolla la maduración espermática y una *cola* en donde se almacenan los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación (Figura 14).

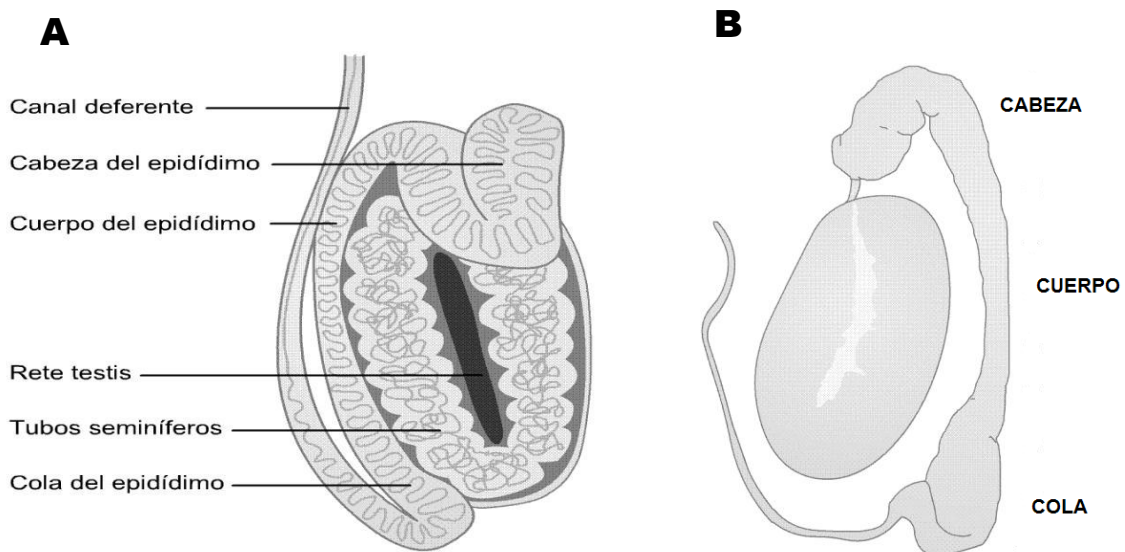


Figura 14: **Dibujos esquemáticos de testículo y epidídimo del verraco.** **A:** Corte que muestra el sistema tubular de testículo y epidídimo. **B:** Regiones anatomofuncionales en las que se divide el epidídimo, vistas desde afuera. Adaptado de <http://www.midiotecavipec.com/porcicultura/porci130906.htm>.

El sitio en donde los espermatozoides comienzan a adquirir capacidad fecundante varía entre especies. En el cerdo, por ejemplo, es en la porción distal de la cabeza del epidídimo; en cambio en la rata en la porción distal del cuerpo del mismo. Como regla general para todas las especies, no es hasta su llegada a la cola del epidídimo en donde se encuentra la mayor proporción de espermatozoides con una potencial capacidad fecundante (Eddy y O'Brien, 1994).

Uno de los cambios más prominentes durante la maduración epididimal es la adquisición de la motilidad por efecto de ciertas sustancias presentes en el fluido epididimal tales como carnitina y glicerofosocolina, entre otras.

Otras modificaciones del espermatozoide en el epidídimo incluyen cambios importantes en la morfología del acrosoma y la estabilización nuclear.

El epidídimo tiene una importante actividad absortiva y secretora. La osmolaridad y la composición química del fluido epididimal varían entre los distintos segmentos del mismo; de esta manera, la membrana plasmática del espermatozoide, permanentemente en contacto con este fluido, se modifica paulatinamente a medida que atraviesa las distintas porciones del órgano (Cooper, 2007). Uno de los cambios importantes lo constituye la disminución y la modificación de los lípidos de membrana, que en el cerdo involucra a todo el espermatozoide cambiando su fluidez, hecho que explica la alta sensibilidad a las variaciones térmicas de los espermatozoides de esta especie (Russell y col., 1984). Otra consecuencia de estas modificaciones en la composición de la membrana plasmática durante el tránsito por el epidídimo es la adquisición de la capacidad de unirse a la zona pelúcida del ovocito y el aumento en la carga neta negativa en

la superficie del espermatozoide, hechos que podrían relacionarse con la incorporación de nuevos polisacáridos y glicoproteínas a la membrana (Turner, 2008).

Cuando el espermatozoide ingresa al epidídimo, su membrana plasmática ya contiene una cubierta de macromoléculas que pueden ser removidas, modificadas o reemplazadas por otras de origen epididimal y cuya forma química predominante es la de glicoproteína.

La síntesis y secreción de glicoproteínas, lípidos y azúcares en el epidídimo, así como el proceso de incorporación de los mismos a la membrana del espermatozoide, determinan finalmente la existencia de importantes diferencias entre la composición de las membranas del espermatozoide testicular y el de origen epididimario (Strzezek y col., 2005).

El transporte de espermatozoides a través del epidídimo se lleva a cabo en 13 a 14 días en el cerdo y se debe al flujo de líquidos de la rete testis, a la actividad del epitelio ciliado de los conductos eferentes y a las contracciones de la pared muscular del conducto epididimal. Los espermatozoides son luego almacenados principalmente en la cola del epidídimo y también en la ampolla del conducto deferente, que posee paredes con musculatura lisa que expelen a los espermatozoides hacia la uretra pélvica durante la emisión, proceso controlado por el sistema nervioso autónomo. En este momento es cuando las células espermáticas toman contacto con las secreciones de las glándulas accesorias y se constituye *el semen* (Ashdown, 1990).

Adicionalmente, durante la eyaculación, se produce la incorporación a la membrana espermática, de las proteínas presentes en el plasma seminal sintetizadas por las glándulas sexuales accesorias y así, una nueva reestructuración de la arquitectura de la membrana espermática (Strzezek y col., 2005).

8. Glándulas sexuales accesorias del verraco

En el verraco, las glándulas sexuales accesorias son la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales o de Cowper (Figura 15).

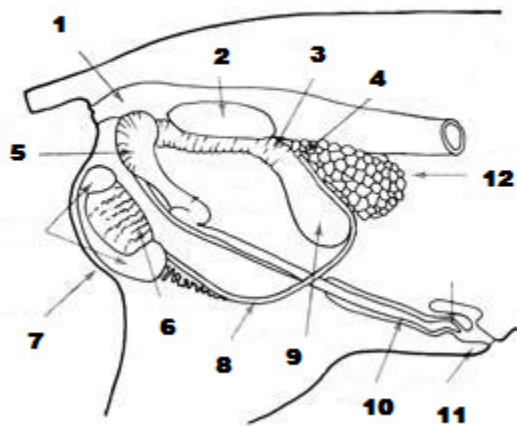


Figura 15. **Diagrama de las vías reproductivas y glándulas sexuales accesorias del verraco.** Según se observan en una disección lateral izquierda: 1. Recto, 2. Próstata, 3. Uretra, 4. Ampulla, 5. Glándulas bulbouretrales, 6. Testículo, 7. Escroto, 8. Conducto deferente, 9. Vejiga, 10. Pene, 11. Prepucio, 12. Vesículas seminales. Adaptado de Ashdown, 1990.

Estas glándulas vierten sus secreciones a la uretra al momento de la eyaculación, mezclándose con la suspensión de espermatozoides y las secreciones ampulares de los conductos deferentes (Ashdown, 1990).

La *próstata* consta de un cuerpo que descansa por fuera del músculo uretral que rodea a la uretra, y otra parte interna o diseminada, distribuida a lo largo de la uretra pélvica. Su cuerpo es grande en verracos y sus principales productos de secreción son el ácido cítrico y la fructosa.

Las *vesículas seminales* se encuentran en posición lateral a las porciones terminales de cada conducto deferente. En el verraco son más voluminosas y menos compactas que en otras especies y secretan ácido cítrico, fructosa, inositol y ergotioenina

Las *glándulas bulbouretrales* son cuerpos pares que se ubican en dorsal de la uretra siendo especialmente grandes en verraco. Constituyen el componente gelatinoso del semen mediante la producción de sialomucoproteínas.

La proporción aproximada en que intervienen las distintas glándulas sexuales accesorias en el volumen final del eyaculado del verraco son: testículo y epidídimo: 2%, glándulas de Cowper: 10-25%, vesículas seminales: 15-20% y próstata: 55-70% (Córdova-Izquierdo y col., 2007).

Una característica interesante de la actividad secretoria de los órganos accesorios del macho es que, en muchos aspectos, órganos considerados como homólogos por los anatomistas difieren en la naturaleza química de sus productos de secreción de acuerdo con la especie. Esto es especialmente cierto en el caso de las secreciones de la próstata y las vesículas seminales. Por ejemplo, mientras

que en el hombre el ácido cítrico es secretado por la próstata y la fructosa por las vesículas seminales, en el cerdo ambas secreciones se originan en las vesículas seminales (Mann, 1974).

La composición química de las secreciones de las glándulas accesorias del cerdo difieren también en otros aspectos de las del hombre y otros animales; como por ejemplo en su alto contenido en glicerofosfatidilcolina e hipotaurina en el epidídimo, la presencia de ergotionina, fructosa, inositol y ácido cítrico en las vesículas seminales y en la producción de una sialoproteína que contiene un 26% de ácido siálico, por parte de las glándulas bulbouretrales.

El espectro de proteínas del plasma seminal del cerdo se origina principalmente en el fluido de las vesículas seminales y en menor medida, de la cola del epidídimo y la próstata (Dostal y Veselsky, 1972; Strzezek, 2002). Estas proteínas se adhieren fuertemente al espermatozoide de cerdo constituyendo un porcentaje sustancial de las proteínas de la membrana plasmática del mismo y se denominan espermadhesinas. Así, la mayor contribución al perfil de polipéptidos de la membrana del espermatozoide ocurre en la eyaculación (Strzezek y col., 2005).

9. El plasma seminal

El plasma seminal (PS) es el fluido en el cual los espermatozoides de mamíferos están suspendidos en el semen. Es una compleja mezcla de secreciones originadas del testículo, epidídimo, y de las glándulas accesorias masculinas, que contiene factores que influyen la capacidad fecundante de los espermatozoides y ejercen importantes efectos en la fisiología reproductiva de la hembra

(Yanagimachi y col., 1994; Waberski y col., 1995; Robertson, 2007). Así, el PS de una gran variedad de mamíferos contiene tanto factores decapacitantes que previenen reacciones acrosómicas inapropiadas como proteínas que, al unirse a la superficie del espermatozoide, mejoran el potencial fecundante del mismo (Rozeboom y col., 2000; Centurion y col., 2003).

9.1 Las espermadhesinas del plasma seminal

Las espermadhesinas son grupos de polipéptidos de 12 a 16 KDa que se expresan en el tracto genital masculino de cerdos, equinos y bovinos. Son el componente proteico principal del plasma seminal, constituyendo en el cerdo el 90% de las proteínas del mismo (Töpfer-Petersen y col., 1998; Strzezek y col., 2005) y suelen encontrarse asociadas periféricamente a la superficie del espermatozoide. En la especie porcina han sido ampliamente estudiadas exhibiendo la mayor diversidad de miembros: AWN-1 y 2, AQN-1, 2 y 3, PSP-I y PSP-II y sus formas glicosiladas. Son proteínas multifuncionales capaces de unirse a diversos sustratos tales como glucosaminoglicanos sulfatados, otros carbohidratos, fosfolípidos e inhibidores de proteasas, sugiriendo una gran variabilidad en cuanto a su actividad biológica y a su participación en el proceso de fecundación.

Las espermadhesinas AWN-1 y 2, AQN-1, 2 y 3 son proteínas de unión a heparina (HBP) y PSP-I y PSP-II no se unen a heparina (Calvete y col., 1995 a y b).

En cerdos, las espermadhesinas AQN-1 y 3, PSP-I y II; AWN-1 y 2 son el mayor producto de secreción del epitelio de las vesículas seminales y su concentración en PS es de 0,6 a 7 mg ml⁻¹ (Dostálová y col., 1994). AWN-1 se sintetiza en rete testis y túbulos rectos (Sinowats y col., 1995) y es el único miembro de su familia presente en espermatozoides epididimales ($6-7 / 10^6$ moléculas por célula).

AWN-1 y AQN-3 interactúan entre sí estableciendo una interacción fuerte con los fosfolípidos de la membrana, lo cual sugiere que permanecen unidas luego de la capacitación. Esto explica que sean identificadas como las principales espermadhesinas involucradas en la unión a ZP como receptores primarios, contribuyendo a la unión inicial y al reconocimiento entre espermatozoide y ovocito (Dostalová y col., 1995; Töpfer-Petersen y Calvete, 1996). AQN-1, en cambio, estaría involucrada en la formación de los reservorios de espermatozoides iniciando la unión de los mismos al epitelio oviductal (Ekhlas-Hundrieser y col., 2005).

El resto de las espermadhesinas constituye formas agregadas que se liberan del espermatozoide durante la capacitación, estarían relacionadas con la formación de una cubierta protectora que evitaría una reacción acrosómica prematura indeseable. En este sentido, estudios recientes indican que estas espermadhesinas protectoras pertenecen al grupo de “non heparin binding” (PSP-I y PSP-II) (Centurión y col., 2003).

Por otro lado, PSP-I y PSP-II, las proteínas más abundantes del plasma seminal del cerdo (más del 50 % del total) muestran actividades proinflamatorias e inmunoestimulantes en el ambiente uterino (Yang y col., 1998; Robertson, 2007).

El hecho de que las espermadhesinas del plasma seminal, que se incorporan a la superficie del espermatozoide en la eyaculación, experimenten remodelaciones permanentes durante la interacción con las células de epitelio oviductal, la capacitación y la unión primaria al ovocito, indica que, al menos en cerdo, son moléculas cruciales en todas las etapas del proceso de fecundación.

10. Los espermatozoides en el tracto femenino

Una vez producida la eyaculación, que en porcinos ocurre en el canal cervical del útero, el semen, con un contenido de espermatozoides de aproximadamente 30×10^9 , alcanza rápidamente la luz uterina. En este sitio, alrededor del 80 % de estas células son eliminadas por reflujo vaginal (Viring y Einarsson, 1981) y fagocitosis mediada por leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Rodriguez-Martinez y col., 1990) y sólo una pequeña subpoblación de espermatozoides es transportada rápidamente hacia el oviducto (Hunter, 1981, 1984; Suarez, 2008), que consiste en tres segmentos, la unión útero-tubal (UUT), el istmo y la ampolla (Figura 16).

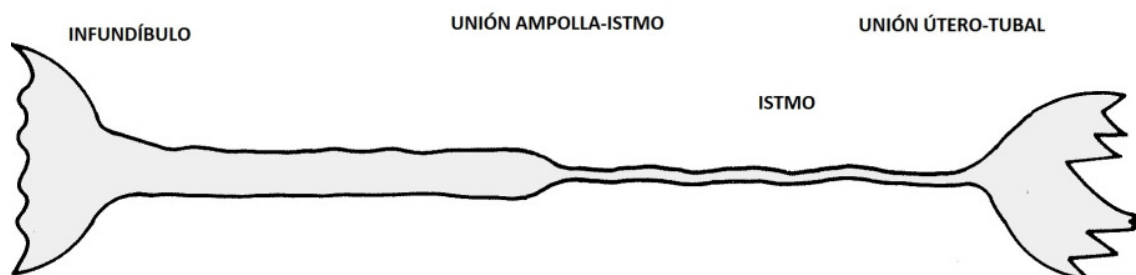


Figura 16: **Dibujo esquemático del oviducto femenino en mamíferos.** Adaptado de Hunter, 2005.

Este rápido avance hacia la unión útero-tubal constituye la llamada *fase rápida* del proceso de transporte en el tracto femenino. La subpoblación que realizó este avance corresponde a los espermatozoides contenidos en aproximadamente los primeros 10 ml de la fracción rica del eyaculado, que se verían beneficiados por la ausencia de ciertas sustancias señal, tales como las espermadhesinas PSP-I/ PSP-II cuya actividad inmunoestimuladora en porcinos provocaría la migración de PMN y la mencionada fagocitosis y que predominan como constituyentes del plasma seminal de las fracciones posteriores del eyaculado (Rodríguez-Martínez y col., 2005; Robertson, 2007). Cuando esta migración leucocitaria ocurre, un número suficiente de espermatozoides ha colonizado los reservorios oviductales o espermáticos, sitio en donde se almacenan de 10^5 a 10^8 espermatozoides durante las primeras 3 horas después del coito (Hunter, 1984) (Figura 17).

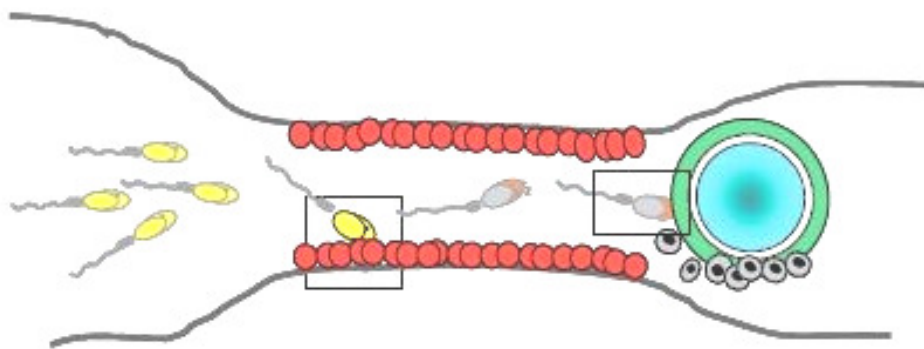


Figura 17: **Interacción espermatozoides – oviducto.** Los espermatozoides son atrapados en la región del istmo del oviducto y almacenados bajo condiciones protectoras. Cerca del momento de la ovulación se inicia el proceso de capacitación y los espermatozoides se disocian del epitelio nadando libremente hacia el sitio de fecundación. El espermatozoide capacitado encuentra y reconoce el ovocito ovulado. Adaptado de Töpfer Petersen y col., 2008.

Esta *colonización* del oviducto para formar los reservorios espermáticos (RE) constituye la *2ª fase del transporte de espermatozoides* por el tracto femenino. En los RE, los espermatozoides están inmersos en el fluido tubárico, en el espacio formado por los pliegues del endosalpinx de la UUT, formando grupos y con sus cabezas orientadas hacia el epitelio (Rodríguez-Martínez y col., 1990; Mburu y col., 1997).

En la hembra porcina, los reservorios espermáticos se forman principalmente durante el período preovulatorio y son funcionales hasta 30 horas después de iniciado el estro (Rodríguez-Martínez y col., 2005).

Estos reservorios preservan la integridad de los espermatozoides y su capacidad fecundante debido a que están libres de leucocitos durante todo el período preovulatorio, evitando la fagocitosis espermática (Rodríguez-Martínez y col., 1990), presentan un fluido mucoide constituido por cantidades importantes de GAGs sulfatados y no sulfatados que los retiene en ese sitio, su temperatura es menor que la corporal (Hunter, 2005), su contenido en bicarbonato es bajo y no se produce el ingreso de calcio al espermatozoide mientras se encuentra unido al epitelio, lo que explica que la mayoría de los espermatozoides retenidos en los reservorios no muestren signos de inicio de la capacitación (Rodríguez-Martínez y col., 2005).

A partir de los RE, un número restringido de espermatozoides (cientos a miles) se liberan en forma gradual y continua hacia el sitio de fecundación en la unión ampolla istmo (UAI), definiendo la *3ª fase del transporte espermático*. En esta fase se produce una importante reducción en el número de espermatozoides que

alcanzan la porción superior del oviducto, hecho que contribuye a la existencia de una proporción 1:1 espermatozoide/ovocito en el momento de la fecundación in vivo, reduciendo las chances de polispermia (Hunter, 1996).

Esta movilización de los espermatozoides desde los RE hacia el sitio de fecundación, parece estar asociada a la ovulación (Brüssow y col., 2006) y se relaciona con modificaciones en el ambiente de los reservorios tales como la desaparición del moco intraluminal, el incremento del movimiento ciliar hacia UAI y/o el aumento de la motilidad del miosalpinx (Johansson y col., 2000).

Adicionalmente, el desprendimiento progresivo y continuo de los espermatozoides desde los reservorios, que ya ocurre antes de la ovulación (incrementándose luego, pero no masivamente durante la misma) puede estar relacionado con inducción gradual de la capacitación luego de la exposición al fluido tubal en los segmentos posteriores, lo que indica que existe un constante reemplazo de espermatozoides capacitados. Considerando que los espermatozoides capacitados tienen un tiempo muy corto de supervivencia, esto garantiza su disponibilidad durante el largo intervalo (alrededor de 30 horas) entre el depósito de espermatozoides y la ovulación en la hembra porcina (Rodríguez-Martínez y col., 2005).

11. Capacitación

Al dejar el testículo, los espermatozoides de mamíferos se encuentran morfológicamente diferenciados, si bien no desarrollaron aún una motilidad progresiva ni la habilidad de fecundar el ovocito. Durante su tránsito por el epidídimo, adquieren la habilidad de moverse en forma progresiva y una potencial capacidad fecundante, característica que se establece luego de su residencia en el tracto femenino durante un cierto tiempo. El conjunto de cambios fisiológicos que experimentan los espermatozoides en este ambiente femenino, son colectivamente denominados “capacitación” (Visconti y Kopf, 1998, Visconti y col., 1998).

La definición de este fenómeno ha sido modificada a través de los años desde 1951 cuando Austin y Chang lo describieran en forma independiente, nombrándolo como “la adquisición de la capacidad fecundante”, y luego como “capacitación”, definida por Austin en 1952. Sin embargo, recién en el año 1970 se establece a la capacitación como un hecho común a todos los mamíferos (Bedford, 1970).

Con algunas modificaciones parciales a partir de esta descripción original, la capacitación sigue definiéndose como un conjunto complejo de cambios estructurales y funcionales del espermatozoide que comienzan con la remoción de factores de estabilización adquiridos desde el plasma seminal, continúan con modificaciones relacionadas con su tránsito a través del tracto femenino y finalizan cuando el espermatozoide es capaz de responder a señales

provenientes de los ligandos de la zona pelúcida a través de una reacción acrosómica (De Jonge, 2005, Vadnais y col., 2007).

11.1 Importancia de los componentes del medio de incubación en el desarrollo de la capacitación

In vitro, es posible inducir la capacitación incubando espermatozoides en medios definidos sin la adición de sustratos biológicos. Visconti y Kopf, 1998, en este sentido, sugieren que la capacitación es modulada intrínsecamente por el propio espermatozoide y que esta célula está preprogramada para capacitarse cuando es incubada en un medio apropiado.

La mayoría de estos medios contienen fuentes energéticas tales como *piruvato*, *lactato* y *glucosa*; proteínas como seroalbúmina bovina (*BSA*), NaHCO_3 y Ca^{++} , siendo estos tres últimos, componentes que se encuentran siempre presentes en los medios capacitantes.

A la BSA se le atribuye el rol de remover el colesterol de la membrana plasmática en algunas especies como ratón, hámster, bovino y humano (Visconti y col., 1995), lo que cambiaría su fluidez permitiendo la prosecución de los eventos de señalización celular relacionados con la capacitación.

En cuanto al *calcio*, su aumento intracelular durante la capacitación ha sido establecido en ratones y humanos (Baldi y col., 1991; Visconti y col., 1995). En cerdo, ha sido demostrada su acción como efector enzimático involucrado en la transducción de señales espermáticas (hecho que se menciona en el siguiente

punto) sugiriendo que este catión divalente juega un rol importante en la capacitación en esta especie (Dubé y col., 2003).

El requerimiento de bicarbonato para la capacitación ha sido establecido en ratón y hámster (Lee y Storey, 1986; Boatman y Robbins, 1991; Shi y Roldan, 1995) y recientemente en porcinos (Gadella y van Gestel, 2004). Sus funciones están relacionadas con el conocido aumento del pH intracelular, la regulación del metabolismo del AMPc espermático mediante la estimulación de la adenilato ciclasa del espermatozoide (Visconti y col., 1990) y el aumento de la fluidez de la membrana plasmática que se observa durante la capacitación en porcinos (Gadella y van Gestel, 2004). Por otro lado, la concentración de bicarbonato es baja en epidídimo, alta en plasma seminal y oviducto y baja en los reservorios espermáticos (Rodriguez-Martinez y col., 2005), lo que sugiere un posible efecto en la supresión de la capacitación en epidídimo y en el tracto femenino antes de la ovulación y su promoción en el tracto reproductivo masculino durante la eyaculación y en el oviducto en el período ovulatorio.

11.2 La heparina como constituyente de los medios de capacitación in vitro

Estudios realizados acerca de la capacitación de espermatozoides bovinos muestran que la capacitación in vitro puede ser consumada en medios que contienen heparina (Parrish y col., 1988) o fluido oviductal, en los cuales el agente capacitante es un glicosaminoglicano (GAG) del tipo heparina. Se cree que los

glicosaminoglicanos podrían promover la capacitación mediante la unión a y la remoción de proteínas del plasma seminal que se encuentran adsorbidas sobre la membrana del espermatozoide, y que normalmente funcionan como inhibidores de la capacitación (Miller y col., 1990). Un hecho interesante es que la heparina también aumenta la síntesis de AMPc (Parrish y col., 1994), eleva pH intracelular, participa en la descondensación de la cromatina nuclear del espermatozoide y del ovocito (Sanchez-Vazquez y col., 2008; Flores-Alonso y col., 2008) y regula los cambios asociados a la capacitación en cuanto a la fosforilación de proteínas espermáticas (Galantino-Homer y col., 1997).

Si bien es en el bovino donde más se ha profundizado en cuanto al efecto de la heparina sobre la fisiología espermática y la fecundación, siendo este GAG un componente habitual en los medios de incubación utilizados para capacitar *in vitro* a los espermatozoides en esta especie (Parrish y col., 1988; Chamberlan y col., 2001), su efecto sobre la capacitación ha sido estudiado en otras especies como equinos y humanos (Valencia y col., 1984; Christensen y col., 1996).

En cerdos, en cambio, la relevancia fisiológica de los glucosaminoglicanos sulfatados del tipo heparina en el tracto reproductor de la hembra porcina, aún no ha sido estudiada.

11.3 Rol de los mensajeros intracelulares en la capacitación: la fosforilación de proteínas espermáticas

Breitbart y Naor (1999) sugieren que la capacitación implica el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio y bicarbonato, los que activan a la adenilato ciclasa espermática para producir AMPc y éste a la protein kinasa A para fosforilar ciertas proteínas.

La capacitación espermática en ratón, hámster, bovino y humano ha sido correlacionada con un aumento de la fosforilación en tirosina de una gran variedad de sustratos (Visconti y col., 1995; Carrera y col., 1996; Galantino-Homer, 1997). La fosforilación en tirosina media una variedad de funciones celulares tales como el crecimiento, control de ciclo celular, ensamblaje del citoesqueleto, regulación del flujo iónico y regulación de receptores (Hunter, 1996).

El incremento de la fosforilación en tirosina durante la capacitación espermática depende de la presencia de BSA, Ca^{++} y NaHCO_3 en el medio en concentraciones equivalentes a los requerimientos para la capacitación en ratones (Visconti y col., 1995). El rol de BSA reside en su ya mencionada capacidad de remover el colesterol, sustentando la idea de que este eflujo de colesterol está íntimamente ligado a los eventos de señalización transmembrana que resultan en la mencionada fosforilación en tirosina.

Los requerimientos de calcio y bicarbonato extracelulares para la fosforilación en tirosina y la capacitación también representan un mecanismo regulatorio de la

señalización celular ya que han mostrado ser activadores de la adenilato ciclasa, enzima responsable de la síntesis de AMPc (Visconti y Kopf, 1998).

Resultados similares en cuanto al incremento de la fosforilación en tirosina de proteínas espermáticas durante la capacitación se vieron en humanos (Carrera y col., 1996), bovinos (Galantino-Homer, 1997) y cerdos (Flesch y col., 1999) entre otros, lo que sugiere que este modelo de señalización celular, que da por resultado la fosforilación de proteínas, podría ser universal para los espermatozoides de mamífero.

11.3.1 La fosforilación en tirosina de proteínas espermáticas en la especie porcina: la p32

Una proteína acrosomal, denominada sp32, fue inicialmente purificada y caracterizada en espermatozoides porcinos como una proteína de unión específica a la proacrosina, involucrada en el empaquetamiento del zimógeno de acrosina dentro de la matriz acrosomal hasta el momento de la reacción acrosómica (Baba y col., 1994; Dubé y col., 2005).

En porcinos, las proteínas espermáticas también se fosforilan en tirosina durante la capacitación (Kalab y col., 1998; Flesch y col., 1999) y estudios recientes indican que muchas de estas proteínas se encuentran en la superficie espermática (Piehler y col., 2006). Se ha demostrado, además, la fosforilación en tirosina de un grupo de proteínas con una masa molecular aparente de 32 KDa, hecho asociado a la capacitación (Tardif y col., 2001, 2003). Dube y col., 2003

demostraron que los niveles de calcio intracelular aumentan sólo en condiciones capacitantes, coincidiendo con la aparición de p32 fosforilada. En consecuencia, la fosforilación de p32 se considera como indicativa del desarrollo de alguna de las etapas del proceso de capacitación en la especie porcina (Dube y col., 2005).

OBJETIVOS

Los experimentos presentados en este trabajo de tesis tienen como objetivo general hacer un aporte al conocimiento sobre la fecundación en la especie porcina.

Para la elaboración de esta tesis se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de técnicas microscópicas de fácil implementación para el estudio de la integridad estructural y funcional del acrosoma del espermatozoide de cerdo.
- Estudio de la dinámica y el rol fisiológico del glucosaminoglicano heparina en diversas etapas del proceso de fecundación en la especie porcina.
- Localización topográfica de las proteínas que unen heparina (HBP) en la membrana espermática y su dinámica de acuerdo con el estado fisiológico del espermatozoide de cerdo.
- Análisis de la relación entre la presencia de proteínas que unen heparina en la membrana espermática y la fecundidad de los verracos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales:

Las muestras de semen utilizadas para todos los experimentos fueron obtenidas a partir de cerdos machos adultos de 2 a 3 años de edad alojados en sistemas de confinamiento y pertenecientes a establecimientos en donde se utilizan rutinariamente para la Inseminación artificial; con una frecuencia de extracción de semen de 4 a 7 días. El método de extracción fue manual, con separación entre fracciones rica y pobre. La fracción rica fue diluida en el diluyente Sperm plus L.C.® (Laboratorio Productos Agropecuarios, I. Sobrino S.L., San Juan de Mozarripa, Zaragoza, España) y luego conservada a 16 °C hasta su utilización en un tiempo no superior a las 24 horas posteriores a la extracción.

2. Reactivos

Excepto donde se indica, los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich, Argentina.

3. Evaluación de la calidad seminal

Las muestras utilizadas en los experimentos de este trabajo fueron previamente analizadas a través de las evaluaciones estándar de calidad seminal: motilidad, vitalidad, concentración, morfología y resistencia osmótica (HOST) que se detallan a continuación, utilizándose sólo aquellas que se ajustaron a los parámetros de normalidad preestablecidos para el cerdo (Althouse, 1997;

Vazquez y col., 1997) tales como: motilidad >70 %, vitalidad >70 %, total de espermatozoides del eyaculado $>20 \times 10^9$, defectos morfológicos <15% y respuesta positiva al test de resistencia osmótica 50-70 %.

3.1 Determinación de la concentración de espermatozoides

La estimación de la concentración espermática se realizó con cámara de Newbawer o hemocitómetro en muestras de semen diluidas 1:100 con solución fisiológica formolada 0,3 %. El total de espermatozoides del eyaculado se obtuvo multiplicando el resultado de dicha concentración por el volumen del eyaculado.

3.2 Evaluación de la motilidad espermática

Para la estimación del porcentaje de células móviles y la calidad del movimiento, se colocaron 10 μ l de muestras de espermatozoides sobre portaobjetos templados a 38 °C que se examinaron con microscopía de luz blanca (x400). La motilidad se determinó mediante la evaluación del porcentaje de espermatozoides que mostraban algún tipo de movimiento del flagelo. La calidad del movimiento espermático se estableció en base a una escala del 0 al 5 (Vazquez y col., 1997):

0: todos los espermatozoides son inmóviles.

1: 10 – 25 % de espermatozoides con motilidad progresiva.

2: 25 – 50 % de espermatozoides con motilidad progresiva.

3: 50 – 70 % de espermatozoides con motilidad progresiva.

4: 70 – 90 % de espermatozoides con motilidad progresiva.

5: todos los espermatozoides muestran movimiento progresivo.

3.3 Evaluación de la vitalidad o viabilidad espermática:

La viabilidad se estimó utilizando la técnica de exclusión eosina – nigrosina (Althouse, 1997). Se mezclaron suspensiones de espermatozoides en igual volumen (5 μ l) con una solución de eosina – nigrosina 0,5 % en solución fisiológica. Las muestras se colocaron sobre un portaobjetos templado a 38 °C realizándose un extendido. Luego de secar el preparado se procedió a la observación con microscopio de luz blanca (x400) contándose al menos 200 células por preparado. Se consideran vivas aquellas células que no presentan coloración y muertas a aquellas que muestran una coloración rosada de la cabeza. Las células con coloración parcial de la cabeza se consideraron como muertas.

3.4 Estimación de la morfología espermática

La morfología se determinó mediante la observación de extendidos de semen prediluido 1:100 en solución fisiológica formolada 0,3 %, con microscopía de luz blanca (x400).

4. Procedimientos de tinción y técnicas microscópicas para la evaluación de la integridad estructural del acrosoma

4.1 Microscopía de contraste de fases

Muestras de semen fueron fijadas mediante el agregado de solución fisiológica formolada 0,3 % hasta una concentración de 1×10^7 espermatozoides/ml. Inmediatamente luego de la fijación, 1 gota de 10 μ l de la muestra fue colocada sobre un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos ejerciendo una leve presión con el fin de disminuir el espesor del preparado. Finalmente, se colocó esmalte de uñas para sellar el preparado y evitar su deshidratación. Los preparados fueron observados utilizando microscopía de contraste de fases (x400), considerándose como espermatozoides con acrosoma intacto a aquellos que mostraron una proyección apical del acrosoma distinguible. En todos los casos, se contaron 200 espermatozoides por preparado.

4.2 Tinción de Wells & Awa

De acuerdo con el método de Wells y Awa (1970) modificado por Berger y col. (1989), se prepararon semanalmente las siguientes soluciones: citrato de sodio al 2,9 %, eosina B al 1 % y Fast green FCF al 1 %, los tres en solución fisiológica. Al momento de la tinción se mezclaron 1,7 partes de etanol 95 %, 1,4 partes de Fast green FCF y 0,7 partes de eosina B utilizándose esta combinación como solución de trabajo.

Se diluyeron muestras de semen en solución fisiológica hasta una concentración de 2×10^6 espermatozoides por mililitro y alícuotas de 0,5 ml se fijaron durante 15

minutos con 0,5 ml de solución fisiológica formolada al 0,02 % y centrifugaron durante 0,5 minutos a 700g. Luego de remover el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones que el paso anterior, volviendo a aspirarse el sobrenadante. El pellet obtenido (con un volumen aproximado de 25 μ l) se resuspendió con 25 μ l de una solución de citrato de sodio 2,9 % y se adicionaron 50 μ l de la solución de tinción antes mencionada. Alícuotas de 10 μ l de espermatozoides teñidos fueron colocadas sobre portaobjetos, realizándose un extendido y luego del secado, observadas mediante microscopio de campo claro (x400), realizándose el recuento de 200 células por preparado.

Fueron considerados como espermatozoides con acrosoma intacto aquellos que tuvieran una densa región color azul verdoso intenso en el ápex de la cabeza, un capuchón color azul verdoso cubriendo los 2/3 anteriores de la cabeza y un color rosado en el tercio posterior de la cabeza. La ausencia de cualquiera de estos patrones se consideró indicativa de alteración acrosomal.

4.3 Tinción Giemsa

Alícuotas de 10 μ l de muestras de semen fueron extendidas, secadas sobre portaobjetos y luego fijadas en solución fisiológica formolada durante 15 minutos. Luego de lavar exhaustivamente los preparados durante 20 minutos con agua corriente, se secaron al aire y sumergieron en la solución de May Grünwald Giemsa durante 90 minutos, después de lo cual se lavó rápidamente en agua destilada y se secó. Se contaron 200 células por preparado mediante el uso de microscopía de campo claro con objetivo de inmersión en aceite (x1000). Se

consideraron como espermatozoides con acrosoma intacto aquellos que mostraron el borde apical del mismo teñido intensamente de color púrpura.

4.4 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de evaluación de la integridad estructural del acrosoma.

Con el fin de evaluar y comparar la sensibilidad de las técnicas Wells & Awa, Giemsa y Contraste de fases en cuanto a su capacidad de detectar cambios paulatinos en la estructura acrosomal, las muestras de semen se sometieron a 2 tratamientos diferentes:

- a. Incubación en diluyente comercial a 16 °C durante 3 días, realizando controles del grado de deterioro acrosomal como consecuencia del almacenamiento, cada 24 horas.
- b. Inducción de la ruptura acrosomal (reacción acrosómica no fisiológica) mediante incubación de los espermatozoides durante 60 minutos en medio TALP suplementado con ionóforo de calcio A23187 (Didion y col., 1989), evaluando el estado acrosomal en 3 tiempos (0, 30 y 60 minutos).

Cada alícuota fue luego teñida con Wells & Awa o Giemsa, u observada en forma directa mediante microscopía de Contraste de Fases.

5. Evaluación del estado fisiológico de los espermatozoides mediante el uso de técnicas microscópicas

5.1 Medio de incubación

El medio de incubación utilizado en todos los experimentos de capacitación fue Tyrode's medium, TALP (Parrish y col.,1988) denominado como Medio de Capacitación (**MC**). Su composición es 96 mM NaCl ; 3,1 mM KCl; 2,0 mM CaCl₂ ; 0,4 mM MgSO₄; 0,3 mM NaH₂PO₄; 20 mM HEPES; 21,6 mM lactato de sodio; 1 mM piruvato de sodio; 15 mM NaHCO₃ y 3 mg/ml BSA. El medio preparado omitiendo el agregado de CaCl₂, NaHCO₃ y BSA, fue denominado medio no Capacitante (**NC**). Además, se utilizaron variaciones de NC agregando 2,0 mM de CaCl₂ (**NCC**); 15 mM NaHCO₃ (**NCB**) o ambos (**NCCB**) de acuerdo con los requerimientos de cada experimento. Con el fin de evitar alteraciones acrosomales como consecuencia del choque osmótico, la osmolaridad de todas las soluciones diferentes a MC se mantuvo entre 285 y 315 mosm/l, mediante el agregado de NaCl.

5.2 Capacitación de los espermatozoides

Una vez colectado el semen, diluido, conservado y contrastado como se indica en el punto 3, se separó la fracción mótil mediante centrifugación a 50g durante 10 minutos a 20 °C. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 700g durante 5 minutos para recuperar los espermatozoides y el pellet se resuspendió en el

medio indicado en cada caso hasta una concentración de 10^7 espermatozoides/ml. Las muestras fueron incubadas a 39 °C en atmósfera de 5 % de CO₂, tomándose alícuotas en diferentes tiempos, de acuerdo con los requerimientos de cada experimento.

5.3 Medición del estado de capacitación de los espermatozoides

5.3.1 Inducción de la reacción acrosómica en espermatozoides capacitados, con ionóforo de calcio A23187

La capacitación espermática se determinó mediante la evaluación de la habilidad de espermatozoides previamente capacitados de experimentar una reacción acrosómica en presencia de ionóforo de calcio A23187 de acuerdo con la técnica de Tardif y col., 1999, introduciendo algunas modificaciones.

Luego de 60 a 120 minutos de incubación de las muestras de espermatozoides, se adicionó ionóforo de calcio A23187 hasta una concentración final de 10 µM, incubándolos durante 15 minutos adicionales a 39 °C en atmósfera con 5 % de CO₂. En los casos en que el medio de incubación no contenía Ca⁺⁺, se agregó 2 mM de CaCl₂ a la solución de ionóforo con el fin de promover la respuesta máxima. A diferencia de la técnica original, en la que se utiliza la lectina *Pisum sativum* conjugada con FITC (Cross y col., 1986), el porcentaje de espermatozoides reaccionados se estimó, antes y después del tratamiento, mediante el uso de la tinción Wells & Awa que se describe en el punto 4.2. Se

consideró, como el porcentaje de espermatozoides capacitados, a la diferencia entre ambas estimaciones.

5.3.2 Tinción con clortetraciclina (CTC)

Se utilizó CTC con el fin de determinar el estado de maduración de los espermatozoides (Wang y col., 1995). La solución de CTC (750 μ M) fue preparada en 20 mM Tris buffer conteniendo 130 mM NaCl y 5 mM DL-cysteina, pH 7,8. Alícuotas de la suspensión de espermatozoides (5 μ l) fueron mezcladas con 5 μ l de la solución CTC sobre la superficie de un portaobjetos templado a 37°C.

Luego de 30 minutos de incubación, se agregaron 5 μ l de una solución al 0,2% de glutaraldehído en 0,5 M Tris pH 7,4. Finalmente, se adicionaron 5 μ l de una solución 0,22 M 1-4-diaza-biciclo (2.2.2) octano (DABCO) en glycerol al 50% con el fin de retardar la pérdida de la fluorescencia. Luego de colocar un cubreobjetos, los bordes del mismo fueron sellados con esmalte de uñas. Los preparados fueron examinados con microscopio Olympus BH2 equipado con óptica de epifluorescencia (excitación con filtro a 405 nm BP y detección de la emisión de fluorescencia de CTC a 455 nm DM).

6. Estudio del efecto de la heparina sobre la fisiología espermática

6.1 Incubación de espermatozoides porcinos en condiciones capacitantes en presencia o ausencia de heparina

Muestras de espermatozoides ($10^7/\text{ml}$) se suspendieron en MC separándose en 3 alícuotas de 1 ml cada una. A dos alícuotas, se les agregó heparina hasta una concentración de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente (Dapino y col., 2006). Las muestras fueron incubadas a 39 °C en atmósfera de 5 % de CO_2 . Se tomaron alícuotas a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos para la evaluación del estado de maduración de los espermatozoides mediante la tinción CTC y la habilidad de los espermatozoides capacitados de experimentar una reacción acrosómica en presencia de ionóforo de calcio A23187. Se determinó además, la viabilidad de los mismos con la técnica de la eosina-nigrosina (punto 3.3).

6.2 Incubación de espermatozoides de cerdo en condiciones capacitantes y no capacitantes y en presencia o ausencia de heparina.

Alícuotas de espermatozoides (2×10^7 espermatozoides/ml) se suspendieron en los diferentes medios (MC, NC, NCC, NCB, NCCB) cuya composición se describe en el punto 5.1 e incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina a 39° C en atmósfera de 5 % de CO_2 durante 120 minutos.

La capacitación se evaluó mediante la tinción CTC y la habilidad de los espermatozoides capacitados de experimentar una reacción acrosómica en

presencia de ionóforo de calcio A23187. También se determinó la viabilidad de los espermatozoides a lo largo de todo el experimento mediante la tinción con eosina.

6.3 Inducción de la reacción acrosómica con heparina

La posible participación de la heparina en el proceso de reacción acrosómica se probó comparando su acción con la de un inductor específico como el ionóforo de calcio A 23187. Se procedió a capacitar previamente a los espermatozoides en medio TALP (CM) durante 120 minutos, dividiendo la muestra en 4 alícuotas a las que se les adicionó heparina (CM+H), ionóforo (CM+I) y ambos (CM+H+I), dejando un testigo (CM). Las muestras se incubaron luego a 39 °C durante 15 minutos adicionales (Dapino y col, 2006). Se evaluó el estado del acrosoma antes y después del tratamiento, con la tinción Wells & Awa.

7. Análisis Estadístico de los datos correspondientes a los puntos 4 a 6

Los promedios y el Desvío Estándar (DE) fueron calculados en todos los casos. Las diferencias entre los diferentes tiempos de incubación dentro de cada concentración de heparina fueron analizados mediante el Test de t de Student. Se utilizó el Test de Duncan (ANOVA a un criterio de clasificación y comparaciones múltiples) para el análisis estadístico de los datos con el fin de observar diferencias en el porcentaje de espermatozoides capacitados en diferentes medios y concentraciones de heparina. El modelo incluyó la presencia o ausencia

de heparina, el medio de incubación y la interacción entre ambos. El nivel de significación se consideró como $p \leq 0,05$.

8. Estudios de proteínas

8.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método descrito por Lowry y col. (1951), utilizando BSA como estándar.

8.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli, 1970. Se utilizaron geles verticales en placas de 80 mm de altura, 100 mm de ancho y 0,75 mm de espesor. El gel de concentración fue preparado con 5 % de poliacrilamida y el gel de separación con 12 %. Las muestras fueron disueltas en solución amortiguadora de siembra compuesta por 60 mM Tris-HCl, pH 6,8 suplementado con 2% de SDS, 10 % de β -mercaptoetanol, 0,005% (P/V) de azul de bromofenol y 10% de glicerol. Antes de realizar la siembra, las proteínas fueron desnaturalizadas por acción del calor en baño de agua a 100 °C durante 3 minutos. Las electroforesis se realizaron a 17 mA.

8.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Luego de realizar las electroforesis, los geles fueron lavados con solución amortiguadora de transferencia (SAT) conteniendo 20% metanol, 0,15 M glicina y 25 mM Tris-HCl (pH 8,3) y se preparó el sistema de transferencia con los elementos en el orden en que se detalla:

- Superficie porosa
- Papel de filtro Whatman 3MM (3 hojas)
- Gel de poliacrilamida con las proteínas a transferir
- Membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Argentina)
- Papel de filtro Whatman 3MM (3 hojas)
- Superficie porosa

La preparación de dicho sistema de transferencia se realizó manteniendo todos los componentes en la SAT y una vez armado, fue colocado en la cuba de transferencia (Trans-blot, Bio Rad) conteniendo el mismo amortiguador. El proceso se desarrolló a un voltaje de 30 mA durante 24 horas a 5 °C, luego de lo cual, las membranas fueron lavadas en agua destilada, secadas al aire y almacenadas envueltas en papel de filtro hasta su utilización.

8.4 Detección de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en presencia o ausencia de heparina

Alícuotas de espermatozoides (3×10^6 espermatozoides totales) incubados durante 0, 60 y 120 minutos a 39 °C en TALP en presencia o ausencia de 10 µg/ml de heparina fueron utilizados para electroforesis y transferencia a una membrana de nitrocelulosa como se describe anteriormente. Las proteínas transferidas fueron visualizadas mediante la tinción de Ponceau S.

Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon mediante la incubación de las membranas en una solución de leche en polvo descremada al 5% en TBS (25 mM Tris-HCl, pH7,4, 150 mM NaCl), las que luego fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina (clon 4G10, Upstate, Lake Placid, NY, USA) durante 1 hora a 1:2.000 en TTBS (TBS + 0,5% de Tween 20). Luego del lavado con TBS (3 veces, 10 minutos cada vez) las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a peroxidasa 1:2.000 en TTBS durante 1 hora y lavadas nuevamente. Las proteínas marcadas fueron reveladas utilizando el kit ECL (GE Healthcare, Argentina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El mismo experimento de detección de la fosforilación de proteínas se realizó con muestras de espermatozoides incubados en (CM), agregando la heparina luego de los 60 minutos de incubación.

8.5 Detección de proteínas afines a heparina (HBP) en espermatozoides enteros y extractos de espermatozoides

8.5.1 Preparación de las muestras de espermatozoides enteros

Para la siembra de espermatozoides en membrana de nitrocelulosa, se utilizaron 3 poblaciones diferentes de los mismos:

- a) Espermatozoides intactos: obtenidos a partir de la muestra original de semen diluido en diluyente comercial.
- b) Espermatozoides capacitados: espermatozoides incubados en medio Tyrodes modificado como se indica en el punto 5.2, durante 120 minutos a 39 °C.
- c) Espermatozoides reaccionados: obtenidos por incubación con Ionóforo de Calcio A23187 en medio TALP durante 60 minutos (Didion y col., 1989).

Alícuotas de 100 µl de espermatozoides con una concentración de 2×10^7 /ml, fueron lavadas 2 veces con PBS y luego sembradas con micropipeta en una membrana de nitrocelulosa.

8.5.2 Preparación de las muestras de extractos de espermatozoides

8.5.2.1 Obtención de membranas periacrosomales

Con el fin de desarrollar un método eficiente de extracción de proteínas de unión a heparina (HBP) y luego determinar la presencia y localización de las mismas en

espermatozoides de cerdo se procedió inicialmente a separar la membrana acrosomal externa y la porción de membrana plasmática que la recubre desarrollando dos técnicas alternativas:

- a) Resuspensión en medio hipotónico de Fructosa / Citrato de Sodio (**FC**) con osmolaridades de 200, 100, 50 y 40 mosm/l, denominadas FC200, FC100, FC50 y FC40, respectivamente.
- b) Incubación con Ionóforo de Calcio A23187 (**I**) a concentraciones de 5, 10 y 20 μ M en medio TALP.

Se probaron 3 tiempos de incubación para ambos métodos (0, 30 y 60 minutos). Se evaluó el número de espermatozoides sin acrosoma, por tinción de Wells & Awa.

8.5.2.2 Fraccionamiento subcelular

Un total de 5×10^8 espermatozoides móviles seleccionados como se describe en el punto 5.2, fueron centrifugados a 700 g durante 10 minutos y resuspendidos en la solución hipoosmótica FC40. Luego de 1 hora de incubación en hielo y centrifugación durante 10 minutos a 1000g, el pellet denominado P1, fue resuspendido en PBS y su estado acrosomal evaluado mediante el método Wells & Awa, confirmándose que el 90 % de los espermatozoides habían perdido sus membranas periacrosomales. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 105.000g, obteniéndose un sobrenadante denominado S2. El pellet obtenido, conteniendo membranas periacrosomales, fue sometido a 2 tratamientos consecutivos:

- a) Incubación en una solución de elevada fuerza iónica (10 mM Tris pH 7,4; 1M NaCl; 10 mM EGTA) durante 1 hora a 5 °C.
- b) Incubación en 10 mM Tris pH 7,4; 0,1% Triton X-100 en PBS durante 1 hora.

Cada tratamiento fue seguido de una ultracentrifugación a 105.000g durante 1 hora obteniéndose las fracciones solubles S3 y S4, respectivamente. El pellet final (P4) y todos los extractos fueron conservados a -20 °C. Antes de su uso, los sobrenadantes obtenidos luego del tratamiento con solución altamente salina (S3) y Tritón X-100 (S4) fueron dializadas contra agua destilada.

Los pasos del proceso de fraccionamiento se resumen en la figura 18.

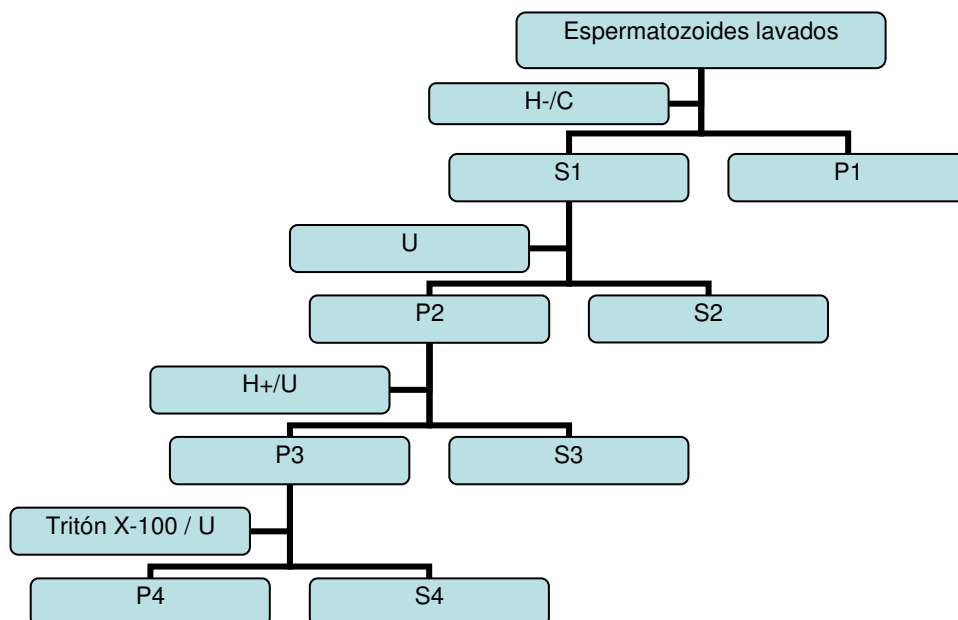


Figura 18: **Esquema de las etapas del proceso de fraccionamiento subcelular de espermatozoides porcinos.** S: sobrenadante, P: pellet, H-: solución hipoosmótica, H+: solución hiperosmótica, C: centrifugación y U: ultracentrifugación.

Luego de determinar la concentración de proteínas, se sembraron 30 µg de proteína por cada fracción (S2, S3, S4, P4 y BSA, como control negativo), utilizando un dispositivo Dot SF (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) en membranas de nitrocelulosa.

8.5.3 Biotinilación de la heparina

Se mezclaron heparina y biotina en una relación molar 1:15 en PBS, incubando con agitación durante 4 horas. Posteriormente se procedió a cortar la reacción con 20 mM Tris pH 7,6 y se sometió a la muestra a un proceso de diálisis contra 20 mM Tris pH 7,6, colocándola en una membrana de 6 a 8 micras de diámetro de poro (cut off).

8.5.4 Tratamiento de las membranas para la detección de HBP

Las membranas de nitrocelulosa sembradas con espermatozoides enteros o con fracciones de espermatozoides, fueron lavadas 15 minutos en PBS y bloqueadas con PBS conteniendo 2,5 % (p/v) polyvinyl pirrolidona durante 2 horas a 5 °C. Luego de 3 lavados con PBS, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con 10 µg/ml de heparina biotinilada en PBS. Luego de lavar las membranas 3 veces con buffer PBS se les adicionó estreptavidina conjugada a peroxidasa diluida en PBS hasta una concentración final de 1 µg/ml, incubándolas durante 1 hora a 5 °C.

Luego del lavado, se determinó la actividad peroxidasa mediante la incubación de la membrana en solución DAB (100 µl de 20 mg/ml de diaminobenzidina en HCl 0,5 N; 7,5 µl de H₂O₂ 30 % en 20 ml finales de 100 mM Tris pH 7,2) durante 5 minutos, seguida de 3 lavados con agua destilada. El mismo experimento se realizó en presencia de 1.000 µg/ml de heparina no marcada como control de especificidad. Las membranas se secaron y fotografiaron con una cámara digital (Olympus C-4000), analizándose las imágenes con Gel-Pro Analyzer version 3.0 (Media Cybernetics).

9. Evaluación de la unión de la heparina a la membrana plasmática del espermatozoide

9.1 Localización topográfica de los sitios de unión a heparina en la membrana espermática

La topografía de los sitios de unión a heparina en los espermatozoides de cerdo se estudió mediante microscopía de fluorescencia indirecta de acuerdo con Debbage y col. (1988). Se utilizaron muestras de espermatozoides capacitados como se indica en el punto 5.2, tomándose alícuotas de 10 µl a los 0, 60 y 120 minutos de incubación, realizándose un extendido y secado de las mismas. Los portaobjetos fueron incubados en PBS conteniendo 5% (p/v) de BSA, durante 2 horas a 39 °C, seguido de la incubación con heparina biotinilada (100 µg/ml) en PBS/BSA (Dapino y col., 2009). Luego del lavado con PBS/BSA, las muestras se incubaron con 100 µg/ml de estreptavidina conjugada a FITC y lavaron

exhaustivamente con buffer PBS/BSA. Finalmente, se agregaron a las muestras 10 μ l de PBS:glicerol (1:9, v/v) colocando luego un cubreobjetos y observándolas simultáneamente con microscopía de contraste de fases y fluorescencia (Nikon E800, Microlat, Buenos Aires, Argentina). Las imágenes se registraron con CCD Spot RT, Digital Instruments.

Estos ensayos se realizaron en espermatozoides capacitados, tal como se indicó anteriormente y en espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes, en TALP basal (NC) y PBS. El mismo experimento se realizó utilizando heparina no marcada (1 mg/ml) como control. La localización topográfica de los sitios de unión a heparina se ensayó también en espermatozoides permeabilizados utilizando tres alícuotas de muestras de espermatozoides no incubados, las que fueron extendidas sobre portaobjetos, secadas y permeabilizadas con metanol durante 15 minutos o con Tritón X-100 al 0,2 y 2 % (v/v) en PBS durante 30 minutos. En cada caso, se contaron 200 espermatozoides por preparado.

9.2 Análisis de fecundidad y HBP

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron 8 animales cuyas características comunes fueron:

- a) Presentar un espermograma normal en relación con los parámetros preestablecidos para el cerdo (Althouse, 1997), teniendo 5 contrastaciones como mínimo, por animal.
- b) El período de estudio fue siempre igual o mayor a un año.

- c) Los animales se encuentran en las mismas condiciones de alojamiento.
- d) El número de hembras inseminadas fue siempre igual o superior a 100.

Se calculó la fecundidad o Tasa de Partos para cada verraco como el número de hembras que parieron luego de la Inseminación Artificial (Clark y col., 1989) en base a registros proporcionados por el criadero y de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Tasa\ de\ Parto = \frac{Cerdas\ paridas}{Cerdas\ inseminadas} \times 100$$

A partir de los valores obtenidos, se constituyeron 2 grupos de animales:

Grupo I: Fecundidad o Tasa de Parto $\geq 70\%$.

Grupo II: Fecundidad o Tasa de Parto $\leq 70\%$

Espermatozoides correspondientes a animales de ambos grupos fueron evaluados mediante fluorescencia indirecta utilizando la técnica de incubación de espermatozoides con heparina biotinilada y revelado con streptavidina-FITC como se detalla en el punto 9.1.

10. Detección de la unión de espermatozoides porcinos a zona pelúcida (ZP) homóloga en presencia de heparina

10.1 Preparación de los portaobjetos con ZP porcina solubilizada

Los ovarios porcinos fueron obtenidos a partir de hembras prepúberes provenientes de un Establecimiento de faena de porcinos (Frigorífico Mattievich, Carcarañá, Santa Fe), transportados al laboratorio a 5°C, lavados con solución fisiológica estéril y conservados a -70°C hasta su utilización. Para la obtención de zona pelúcida solubilizada se utilizó el método de Dumber y Raynor, 1980. Se procesaron 200 ovarios en grupos de 20 cada vez, colocándolos en placas de Petri con una solución de extracción compuesta por PBS, pH 7,2, con el agregado de 2 mM de citrato de sodio y 2 mM EDTA a 5°C. Mediante el uso de un bisturí, los ovarios fueron cortados exhaustivamente hasta la obtención de una pulpa que fue lavada con 20 ml de la solución de extracción y filtrada con una gasa doble. Una alícuota del producto obtenido fue colocada en una placa de Petri y observada con lupa estereoscópica (x4) con el fin de observar la presencia y abundancia de los ovocitos obtenidos. Finalmente, el buffer conteniendo los ovocitos fue sometido a un proceso de filtración utilizando un Cell Dissociation Sieve, Tissue Grinder kit (Sigma-Aldrich) con filtros de acero de diámetro de poro decreciente (210, 152 y 70 μm) de acuerdo con el método de Hedrick y Wardrip, 1986. Los ovocitos retenidos en el filtro de 70 μm de diámetro, fueron lavados con 10 ml de PBS y transferidos a un homogeneizador Potter. Mediante el pasaje a través del émbolo de teflón 20 a 30 veces se procedió a la ruptura de los ovocitos y separación de la zona pelúcida (ZP).

La ZP resultante fue recolectada en un filtro de 40 μm , lavada exhaustivamente con agua destilada, solubilizada en 5 mM de bicarbonato de amonio, pH 8,2, a 70°C durante 30 minutos y centrifugada a 10.000g durante 10 minutos con el fin de remover partículas que no son ZP.

10.2 Detección de la unión de los espermatozoides a ZP solubilizada

Alícuotas de ZP solubilizada conteniendo 0,75 μg de proteína, fueron depositadas en forma de gota sobre cubreobjetos de 10 cm de lado y secadas en estufa a 37°C (Richardson y col., 1991). Los cubreobjetos con ZP fueron luego invertidos sobre la superficie de un portaobjetos templado a 37°C que contenía una gota de 10 μl de una suspensión de espermatozoides ($10^6/\text{ml}$) previamente capacitados en TALP durante 60 minutos en presencia o ausencia de heparina. Los portaobjetos fueron incubados en cámara húmeda a 37°C durante 15, 30 o 60 minutos y lavados cuidadosamente luego de cada tiempo con PBS (Richardson y col., 1991). Un cubreobjetos adicional sin ZP fue usado como control. Las muestras fueron observadas con microscopio de campo claro (x400), contando la cantidad de espermatozoides unidos en 10 campos microscópicos por cada muestras, elegidos en forma arbitraria.

11. Análisis estadístico de los datos correspondiente a los puntos 9 y 10

Los promedios y el Desvío Estándar (DE) se calcularon en todos los casos. El análisis estadístico se realizó mediante Análisis de la Variancia (ANOVA). Cuando los resultados del Test f fueron significativos para ANOVA, los promedios

individuales fueron además testeados mediante el modelo de Tukey, verificándose los supuestos mediante análisis de residuos.

CAPÍTULO 1

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE MÉTODOS DE DETECCIÓN DE INTEGRIDAD ACROSOMAL Y CAPACITACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El acrosoma es una gran vesícula secretoria derivada del Sistema de Golgi, localizada en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, que contiene enzimas responsables de la digestión de las cubiertas del ovocito (cumulus oophorus y zona pellucida). La liberación o exocitosis de dichas enzimas acrosomales, la reacción acrosómica, conduce a la penetración del espermatozoide y permite la fecundación (Shapiro y Eddy, 1980; Aguas y Pinto da Silva, 1985).

El estudio del acrosoma mediante el uso de técnicas que detecten por un lado su *integridad estructural* y así, la potencial capacidad fecundante de un eyaculado, y por otro lado, las modificaciones del mismo en relación a los cambios del estado fisiológico del espermatozoide, resulta crucial.

El examen ideal debe ser preciso, de resultados constantes, rápido, aplicable a un pequeño número de células, inocuo para la función espermática y utilizable en todos los fluidos biológicos o medios en que se encuentren los espermatozoides (Cross y Meizel, 1989).

Entre las técnicas actualmente en uso para evaluar la integridad estructural del acrosoma se encuentran: la *microscopía de contraste de fases y contraste diferencial (DIC)*, la *microscopía de campo claro complementada con el uso de colorantes* y las *pruebas de fluorescencia* mediante el uso de anticuerpos y lectinas.

En mamíferos cuyos espermatozoides poseen un acrosoma grande (cobayo, hámster) *contraste de fases y DIC* detectan fácilmente la reacción acrosómica parcial o completa. Ambos métodos también pueden ser útiles, aunque con más dificultad, para algunos espermatozoides con acrosomas más pequeños, como el caso del cerdo (Pursel y col., 1972, 1974). Ninguno de los dos métodos resulta apropiado para espermatozoides humanos. Con estas técnicas, la observación del extremo apical (el delgado borde anterior del acrosoma) es indicativa de la integridad acrosómica.

Dentro de las tinciones fluorescentes, *las lectinas* son reactivos que se unen a los glicoconjugados de la matriz acrosomal o la membrana acrosomal externa. En cerdos, la lectina *Pisum sativum* agglutinin (PSA) extraída de la lenteja comestible, conjugada con FITC, es la más utilizada (Maxwell y col., 1996; De Andrade y col., 2007). Dentro de este grupo también se encuentran los anticuerpos contra antígenos intracelulares asociados al acrosoma (Cross y col., 1986, 1989) ya sea policlonales o monoclonales.

Si bien la mayoría de los métodos nombrados son ampliamente utilizados en investigación, no representan una alternativa accesible a los fines prácticos debido a que constan de un prolongado y complejo desarrollo, los preparados no

pueden conservarse para su observación posterior o los protocolos requieren de un equipo específico e insumos de alto costo que los hace inaplicables a un plan rutinario de control de calidad en los establecimientos que procesan semen porcino. Como consecuencia de ello, no suelen realizarse en forma rutinaria evaluaciones del estado acrosomal perdiéndose valiosa información sobre la calidad de un eyaculado.

Las técnicas que utilizan colorantes ofrecen una alternativa interesante tanto con fines de investigación, por su estabilidad, como con fines prácticos. Las ventajas de estos protocolos incluyen la posibilidad de hacer tinciones permanentes (lo que permite planificar su observación), el uso de reactivos accesibles y económicos y la habilidad de utilizar para su observación, un microscopio de luz blanca estándar. Por otro lado, muy pocas de ellas han sido validadas con otras técnicas de evaluación estandarizadas.

Entre las tinciones para microscopía de campo claro o luz blanca utilizables para teñir el acrosoma se encuentran la tinción con Giemsa (Hancock, 1957; Didion y col., 1989) estandarizada en muchas especies y las técnicas que combinan dos colorantes como la desarrollada por Wells y Awa, 1970; Chacarov y Mollova, 1976; Taylor, 1982; Berger y col., 1989).

Las tinciones que evalúan el estado fisiológico del espermatozoide comprenden el *antibiótico fluorescente clortetraciclina (CTC)*, que produce patrones de fluorescencia capaces de reflejar el estado acrosomal en relación con cambios metabólicos del espermatozoide, diferenciando una población de capacitados, entre otros. Esta técnica se utiliza en muchas especies tales como ratones,

humanos, equinos y cerdos (Lee y col., 1987; Varner y col., 1987; Endo y col., 1988; Mattioli y col., 1996).

Otra técnica, desarrollada más recientemente es la del *ionóforo de calcio A23187* (Tardif y col., 1999) que se fundamenta en el hecho de que el espermatozoide capacitado es aquel capaz de experimentar una reacción acrosómica fisiológica en presencia de un inductor específico. Este método, permite, al igual que CTC, la diferenciación de una subpoblación de espermatozoides capacitados.

En este trabajo se probaron y compararon diversas técnicas de evaluación de la integridad estructural del acrosoma y técnicas de valoración de las características acrosomales de acuerdo con el estado fisiológico del espermatozoide de cerdo.

2. RESULTADOS

2.1 Evaluación de la integridad estructural del acrosoma

Se evaluaron y compararon las técnicas de Contraste de fases (Figura 19), Giemsa (Figura 20) y Wells & Awa (Figura 21), en cuanto a su capacidad de detectar cambios paulatinos en la estructura acrosomal por efecto de la conservación y como consecuencia de la inducción de la reacción acrosómica con ionóforo de calcio como se señala en el punto 4.4.

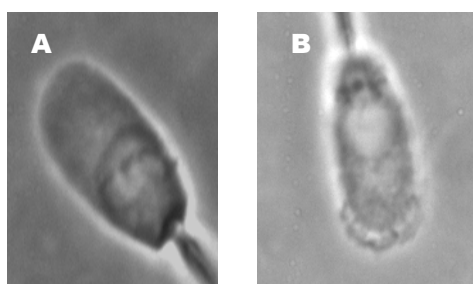


Figura 19: **Microfotografía de espermatozoides de cerdo observadas mediante microscopía de Contraste de fases (x400).** **A:** espermatozoide con acrosoma intacto. **B:** espermatozoide con acrosoma dañado.

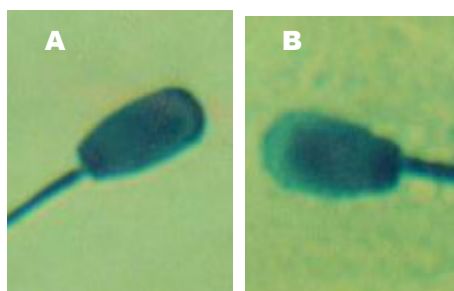


Figura 20: **Microfotografía de espermatozoides teñidos con May Grünwal Giemsa (x400).** **A:** espermatozoide con acrosoma intacto en donde se observa el extremo apical, **B:** espermatozoide con acrosoma dañado.

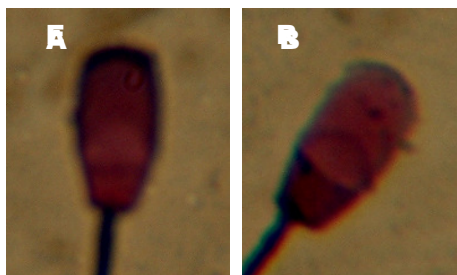


Figura 21: **Espermatozoides teñidos con la técnica Wells & Awa, evaluados mediante microscopía de campo claro (x400).** Se observan 2 patrones de tinción: **(A) enteros** con una línea color verde oscuro en el borde apical de la cabeza, un capuchón rosa oscuro en los 2 tercios anteriores de la cabeza y rosa claro en el tercio posterior. **(B) reaccionados** no presentan el borde apical oscuro y el resto de la cabeza es color rosado uniforme.

Según se observa en las figuras 22 y 23, con ambos tratamientos disminuyó paulatinamente el porcentaje de acrosomas intactos detectado. Los valores obtenidos se compararon mediante ANOVA, no observándose diferencias significativas entre los tres métodos utilizados en cuanto a su sensibilidad para la detección de la ruptura acrosomal ($p>0,01$).

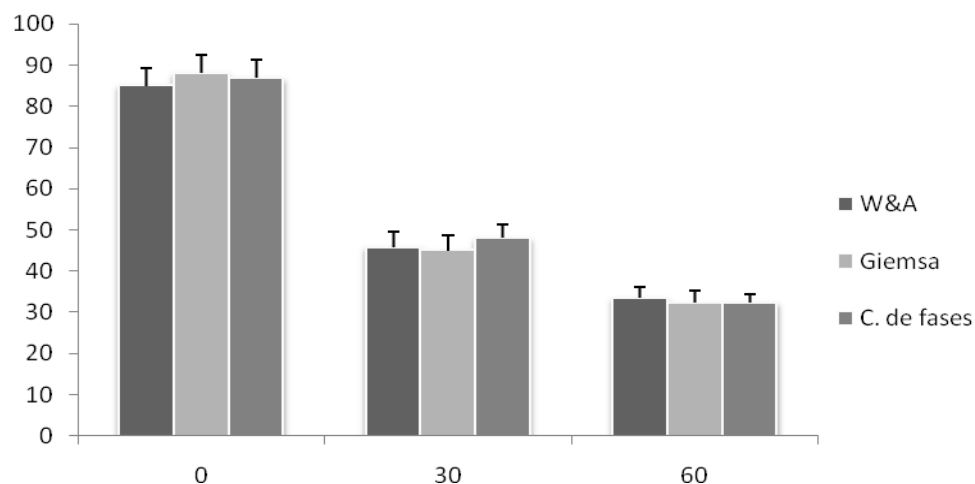


Figura 22: **Porcentaje de acrosomas intactos en espermatozoides conservados durante 3 días a 16 °C.** Los espermatozoides fueron teñidos con tinciones Wells & Awa, Giemsa u observados mediante microscopía de contraste de fases. Los valores corresponden al recuento de 2000 células (5 replicaciones, 2 extendidos por muestra, 200 células por extendido) y se expresan como media \pm DE.

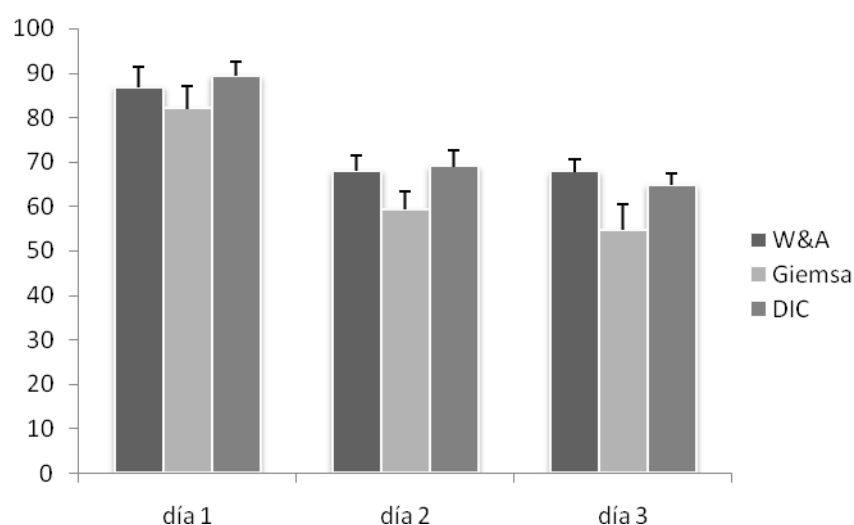


Figura 23: **Porcentaje de acrosomas intactos en espermatozoides incubados en medio TALP suplementado con ionóforo de calcio.** Los espermatozoides se tiñieron con Wells & Awa, Giemsa y se observaron con microscopio de contraste de fases. Los valores corresponden al recuento de 2000 células (5 replicaciones, 2 extendidos por muestra, 200 células por extendido) y se expresan como media \pm DE.

2.2 Evaluación del estado fisiológico del espermatozoide

El estado fisiológico de los espermatozoides se evaluó mediante la observación de los patrones de tinción con CTC (Figura 24) y el uso de ionóforo de calcio como se describe en el punto 5.3, comparándose las respuestas de los espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes (PBS) y capacitantes (TALP) (Figuras 25 y 26).

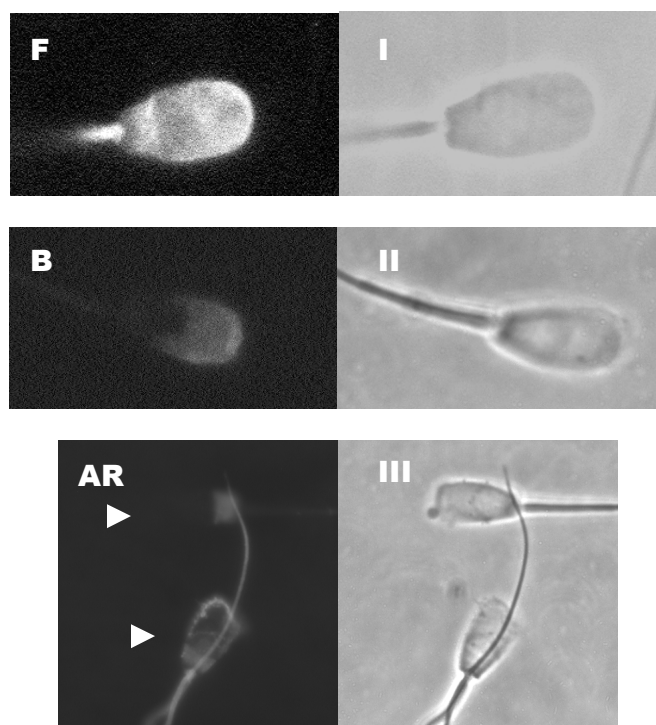


Figura 24: **Tinción de espermatozoides con Clortetraciclina observados con microscopio de epifluorescencia.** Se observaron 3 patrones de fluorescencia: **F**: espermatozoide no capacitado con fluorescencia uniforme sobre la cabeza, **B**: espermatozoide capacitado con fluorescencia en la región acrosomal, **AR**: espermatozoides reaccionados con escasa fluorescencia en la cabeza y una banda brillante a lo largo del segmento ecuatorial. Las flechas indican: arriba, espermatozoide totalmente reaccionado; abajo, espermatozoide reaccionando). **I**, **II** y **III** representan a las mismas imágenes observadas por Microscopía de Contraste de Fases.

Cuando los espermatozoides fueron incubados en PBS, los espermatozoides mostrando patrón B de CTC o reaccionados con ionóforo, no arrojaron diferencias significativas con respecto a los espermatozoides no incubados (tiempo 0). Sin embargo, estos valores fueron significativamente diferentes en espermatozoides incubados en TALP en cada tiempo de incubación ($p < 0,001$).

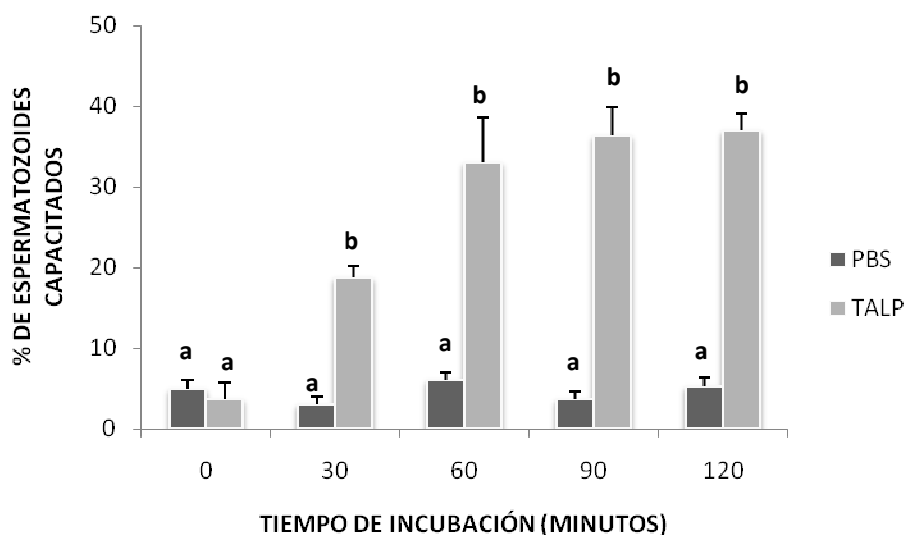


Figura 25: **Porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B) teñidos con de clortetraciclina (CTC).** Los espermatozoides fueron incubados durante 120 minutos a 39°C en medio no capacitante (PBS) y capacitante (TALP). Los valores corresponden al promedio \pm DE de 3 animales y 100 células contadas/muestra. (a, b) letras diferentes indican diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides capacitados ($p < 0,0001$).

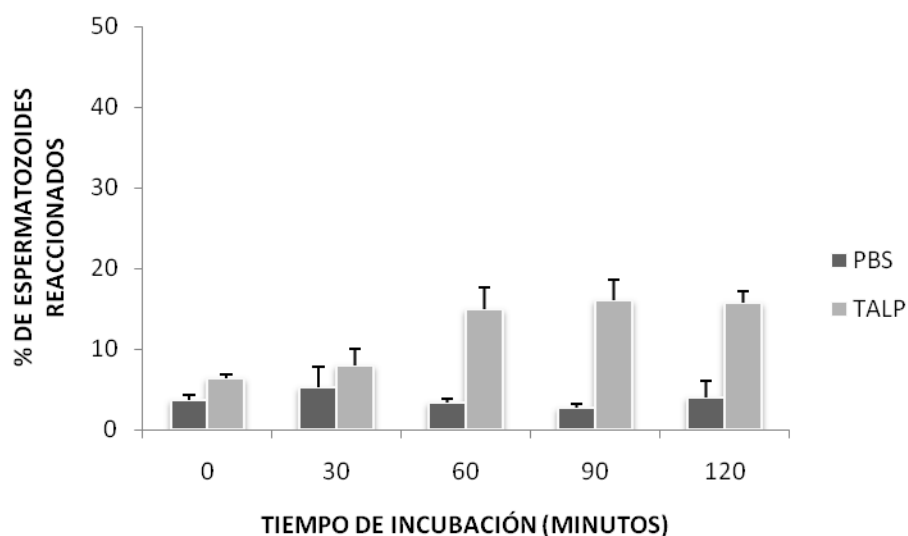


Figura 26: **Porcentaje de espermatozoides reaccionados con ionóforo de calcio A 23187.** Espermatozoides incubados en medio no capacitante (PBS) y capacitante (TALP) en los tiempos que se indican, sometidos a una incubación adicional con ionóforo de calcio y tinción con Wells & Awa (punto 5.3.1). Cada valor representa el promedio de 3 replicaciones en diferentes animales \pm DE y 100 espermatozoides contados en cada preparado. (a y b) letras diferentes denotan diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides reaccionados ($p < 0,0001$).

3. DISCUSIÓN

El acrosoma almacena enzimas hidrolíticas y proteínas cruciales para la interacción con el ovocito durante la fecundación (Yanagimachi, 1989), por lo que la evaluación de su integridad y su morfología resulta esencial.

Ciertas anormalidades o deformaciones acrosomales han sido asociadas con infertilidad en cerdos, así como la pérdida de la proyección apical del acrosoma, que se asocia con la pérdida concomitante de la capacidad fecundante en espermatozoides conservados in vitro (Nicander y Bane, 1966).

La evaluación del acrosoma mediante el uso de lectinas fluorescentes, y la microscopía de contraste de fases son métodos muy utilizados en investigación debido a su gran fidelidad. Sin embargo, no son accesibles a los fines prácticos debido a su prolongado y complejo desarrollo y la necesidad de contar con equipos e insumos costosos que dificultan su uso en los laboratorios que procesan semen porcino.

El uso de colorantes ofrece las ventajas de que sus protocolos permiten hacer tinciones permanentes y así programar su observación, los reactivos son económicos y el equipamiento necesario consiste en un microscopio de luz blanca estándar. La desventaja que presentan estas técnicas que utilizan colorantes es que muy pocas de ellas han sido validadas con otras técnicas de evaluación estandarizadas.

La técnica de tinción de Wells & Awa (Wells y Awa; 1970), ha demostrado ser confiable en cuanto a su capacidad de diferenciar los distintos subdominios de

la membrana plasmática de espermatozoides a nivel de la región acrosomal, rápida y de bajo costo.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad de la tinción Wells & Awa en cuanto a su capacidad de detectar cambios paulatinos en la estructura acrosomal comparándola con contraste de fases y Giemsa, mostrándose igualmente eficaz en la detección de dichos cambios por acción de un inductor de reacción acrosómica como el ionóforo o por efecto de la conservación, hecho de suma importancia en los establecimientos en donde se almacenan dosis seminales durante varios días.

Las ventajas que ofrece esta técnica de tinción con respecto a otras como las que emplean sustancias fluorescentes o el contraste de fases, son la posibilidad de observar los extendidos con un simple microscopio de campo claro y la estabilidad de los preparados, que hace que puedan ser guardados y observados posteriormente. Por otro lado, su escaso tiempo de preparación y secado favorece el mantenimiento de la integridad de las membranas, ofreciendo una ventaja adicional para esta técnica con respecto a las de su misma clase.

Todas estas características hacen que esta tinción pueda ser propuesta como de elección para su incorporación a los exámenes rutinarios de calidad seminal relacionados con la integridad estructural del acrosoma, tanto en la práctica diaria en los establecimientos productores de dosis de semen porcino destinadas a Inseminación Artificial como en el laboratorio de Investigación.

En relación con la evaluación del estado fisiológico del espermatozoide, esto es, la detección mediante técnicas microscópicas de modificaciones estructurales de la membrana del espermatozoide como reflejo de cambios en su estado metabólico, existe una variedad menor de técnicas adecuadas para este fin. Entre ellas, el uso del antibiótico fluorescente clortetraciclina que genera patrones de fluorescencia cuya naturaleza podría estar relacionada con el aumento de la emisión de la fluorescencia de CTC cuando éste se une a proteínas de unión al calcio sobre la membrana del espermatozoide (Saling y Storey, 1979), reflejando la modificación de estas proteínas, hecho que efectivamente ocurre durante la capacitación (Darszon y col., 1999). Los patrones de CTC varían entre especies por lo que su uso en especies nuevas requiere su validación y la asignación de los patrones correspondientes. La técnica ha sido validada en ratones, humanos y equinos (Lee y col., 1987; Varner y col., 1987; Endo y col., 1988). En el cerdo han sido diferenciados tres patrones de tinción que se corresponden con las categorías de espermatozoide intacto, capacitado y reaccionado (Mattioli y col., 1996) (Figura 24). Las ventajas de este método son su rapidez y que posee la habilidad única de diferenciar una subpoblación de espermatozoides capacitados dentro de una población de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes. Sin embargo, algunos autores cuestionan esta clasificación argumentando que CTC sólo mide una o algunas de las etapas iniciales de la capacitación y no el proceso completo (Tardif y col., 1999). Los mismos autores sugieren que el espermatozoide capacitado es aquel capaz de experimentar una reacción acrosómica fisiológica en presencia de un inductor específico, como lo es la

zona pelúcida, por lo que proponen un método de evaluación que consiste en determinar la habilidad de los espermatozoides previamente capacitados, de experimentar una reacción acrosómica en presencia de ionóforo de calcio A23187. Esta técnica fue validada mediante la comparación con resultados obtenidos con la incubación de espermatozoides capacitados con zona pelúcida solubilizada (Tardif y col., 1999).

En este trabajo se probaron ambas técnicas de evaluación del estado fisiológico de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y no capacitantes, obteniéndose valores de capacitación que coinciden con los habitualmente hallados en la especie porcina.

Si bien los valores absolutos de capacitación obtenidos utilizando CTC o el inductor de reacción acrosómica ionóforo de calcio fueron diferentes, siendo más altos para CTC, esta diferencia podría explicarse argumentando que CTC muestra el incremento de la fluidez de la membrana, hecho que ocurre mucho antes de que el espermatozoide se encuentre en condiciones de experimentar una reacción acrosómica (Tardif y col., 1999).

Ambas técnicas de evaluación son eficientes en cuanto a su capacidad de diferenciar y mostrar la evolución del proceso de capacitación como consecuencia de la incubación de los espermatozoides de cerdo en medios capacitantes.

CAPÍTULO 2

LA HEPARINA: SU EFECTO SOBRE LA FISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO

1. INTRODUCCIÓN

Los glucosaminoglucanos son polisacáridos no ramificados formados por repeticiones de pares de azúcares en donde uno de ellos contiene un grupo amino (N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina) y el otro es normalmente la galactosa o el ácido glucurónico. Estos azúcares poseen grupos carboxilo (COO^-) y grupos sulfato (SO_4^-) cargados negativamente. Son componentes esenciales de la matriz extracelular, contribuyendo al reconocimiento, la adhesión y la regulación del crecimiento celular. Se caracterizan individualmente en función de su composición de azúcares y otras características, tales como el grado de sulfatación. En este sentido, pueden distinguirse cuatro grupos principales: a) GAG no sulfatados como el hyaluronan, b) el GAG sulfatado keratan sulfato, c) heparina y heparan sulfato y d) el galactosaminoglicano sulfatado condroitina sulfato/ dermatán sulfato (Thientai y col., 2000).

La heparina está formada por dímeros de N-acetilglucosamina más el ácido glucurónico o idurónico (Figura 27).

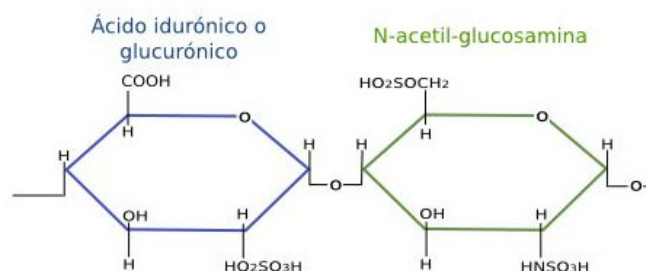


Figura 27. **Composición de la heparina.** Adaptado de Lamoureux y col., 2007.

La heparina ha sido ampliamente utilizada in vitro para el estudio del rol endógeno de los GAGs secretados por el epitelio del tracto reproductivo femenino. Su efecto capacitante en espermatozoides de bovinos (Parrish y col., 1988; 1989; Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006), equinos (Christensen y col., 1996) y humanos (Valencia y col., 1984) ha sido establecido. En cerdos, el rol de los GAGs sulfatados como agentes capacitantes permanece incierto.

En bovinos, la heparina promueve la capacitación posiblemente mediante la unión a y posterior remoción de las proteínas del plasma seminal que se adsorben a la membrana del espermatozoide durante la eyaculación y podrían inhibir la capacitación (Miller y col., 1990). Actualmente se sabe que en porcinos, algunas espermadhesinas son removidas durante la capacitación, mientras que otras permanecen unidas al espermatozoide e interactúan con componentes de la zona pelúcida (Dostalová y col., 1995; Centurión y col., 2003; Monásková y col., 2007; Töpfer-Petersen y col., 2008). Estas últimas pertenecen a la familia de las proteínas de unión a heparina (HBP), por lo que

se podría considerar la posibilidad de que la heparina tuviera un efecto sobre la interacción espermatozoide-ZP.

En bovinos, la heparina induce, entre otras cosas, la fosforilación de ciertas proteínas espermáticas durante la capacitación (Chamberland y col., 2001). La fosforilación en residuos de tirosina de una proteína con una masa molecular aparente de 32 kDa ha sido detectada en cerdos en relación con la capacitación (Flesch y col., 1999; Tardif y col., 2001; Bailey y col., 2005). El efecto de la heparina sobre este mecanismo bioquímico característico de la capacitación no ha sido evaluado en espermatozoides porcinos.

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de ensayos biológicos con el fin de caracterizar el rol de la heparina sobre la fisiología espermática en porcinos, haciendo especial hincapié en el proceso de capacitación *in vitro* y la fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas. Por otro lado, se analizó la participación de la heparina en los procesos de reacción acrosómica e interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida en la especie porcina.

2. RESULTADOS

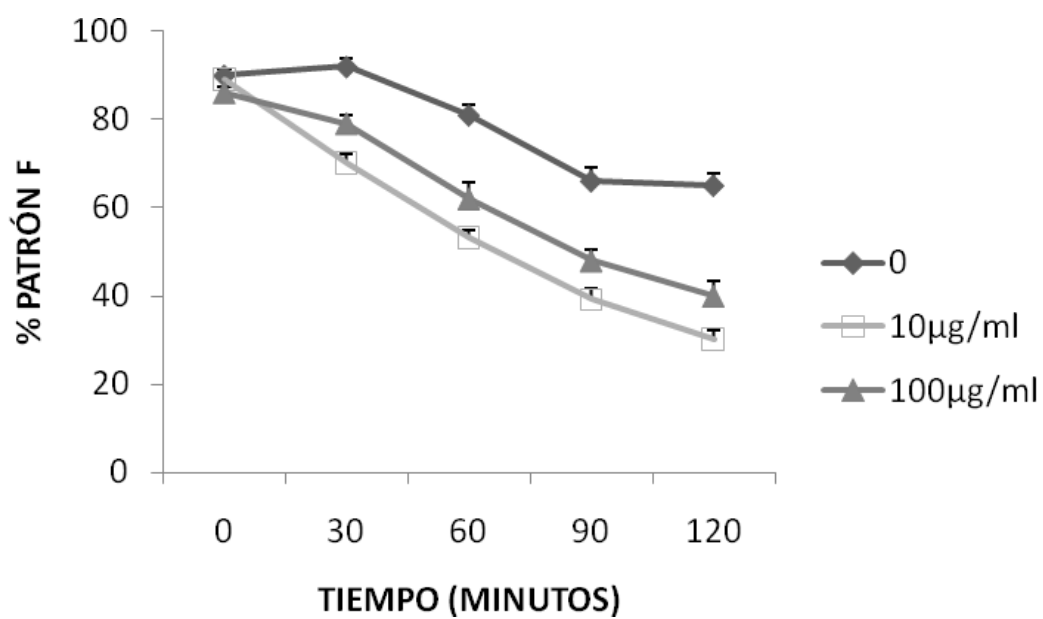
2.1 Efecto de la concentración de heparina sobre los patrones de CTC en condiciones capacitantes

Con el fin de evaluar el efecto de la heparina sobre el estado fisiológico de los espermatozoides, suspensiones de los mismos fueron incubadas en CM con diferentes concentraciones de heparina como se indica en el punto 6.1, evaluándose su estado fisiológico mediante la técnica fluorescente Clortetraciclina y la tinción supravital de eosina-nigrosina. Los patrones de tinción con CTC (Figura 24) y eosina-nigrosina se ensayaron cada 30 minutos hasta 120 minutos. Se observaron diferencias significativas en la distribución de los patrones de CTC en células incubadas con y sin heparina en CM (Figura 28). El porcentaje de patrón B sin heparina fue comparable al valor usualmente observado en espermatozoides porcinos y el mismo fue mayor en presencia de heparina, independientemente de su concentración en todos los tiempos de incubación utilizados (Tabla 1, figura 28-B) ($p \leq 0.05$). El número de células viables, evaluadas mediante la técnica de la eosina-nigrosina luego de 120 minutos de incubación, fue significativamente menor cuando se utilizó la concentración de heparina de 100 $\mu\text{g/ml}$ que en presencia 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina (71 ± 1 y 39 ± 2 , respectivamente) (Figura 29). Considerando esto, se eligió la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina y el tiempo de incubación de 120 minutos como parámetros para los siguientes experimentos.

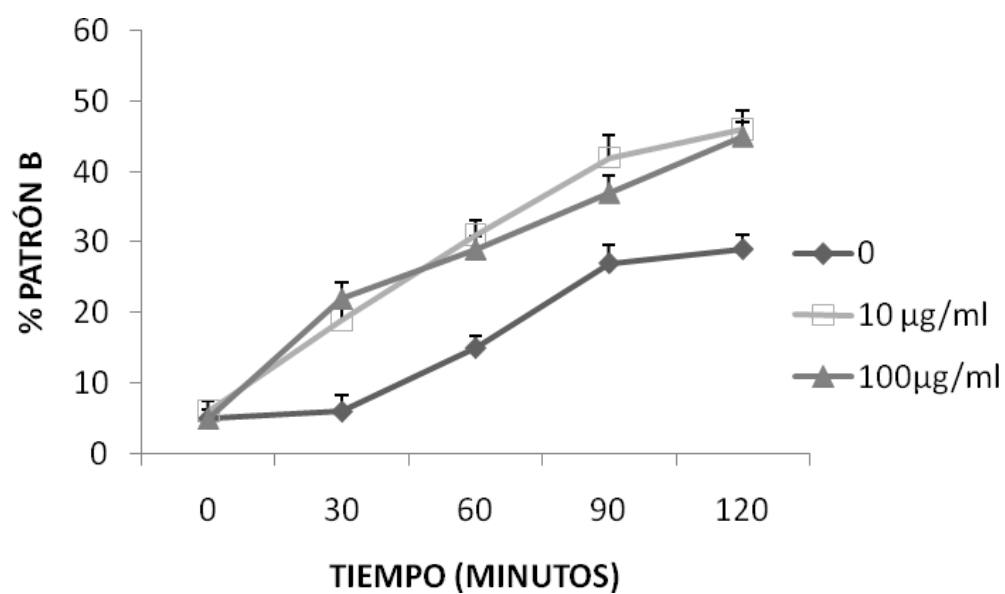
Las figuras 28-A y 28-C muestran la evolución del resto de las poblaciones de espermatozoides (enteros y reaccionados) a medida que se va desarrollando la

capacitación, observándose una disminución de los enteros y un aumento de los reaccionados.

A



B



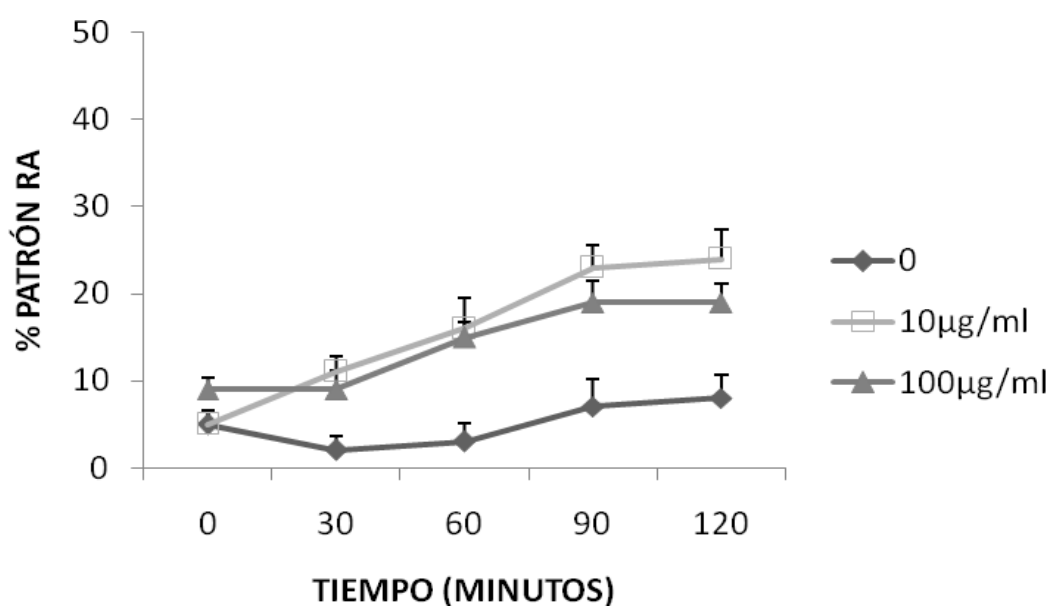
C

Figura 28. **Evolución de los patrones de tinción con CTC de espermatozoides porcinos incubados con diferentes concentraciones de heparina.** Los espermatozoides fueron incubados en MC durante 0, 30, 60, 90 y 120 minutos (39°C) con diferentes concentraciones de heparina. **(A)** espermatozoides enteros (patrón F), **(B)** espermatozoides capacitados (patrón B), **(C)** espermatozoides reaccionados (patrón RA). Las referencias de la derecha muestran las distintas concentraciones de heparina. Cada valor representa el promedio de 4 repeticiones \pm DE, con un mínimo de 200 espermatozoides contados.

Tabla 1. **Efecto de la heparina sobre la capacitación espermática**

período de incubación (minutos)	Concentración de heparina (ug/ml)		
	0	10	100
0	5,0±1,8	6,0± 1,8	5,25±1,2
30	6,5±2,6	15,0±1,8	18,5±1,9
60	15,5±4,0	31,5±3,1	29,7±2,5
90	27±1,6	38±2,4 (*)	41,7±2,2 (*)
120	28,7±2,6	46,5±3,4 (*)	45,7±4,6 (*)

Porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B determinado mediante CTC) luego de la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes (CM) en el tiempo indicado y con diferentes concentraciones de heparina. Cada valor representa el promedio de 4 replicaciones en diferentes animales \pm DE (se evaluaron 200 espermatozoides por cada experimento). (*)Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el porcentaje de patrón B en relación con el control.

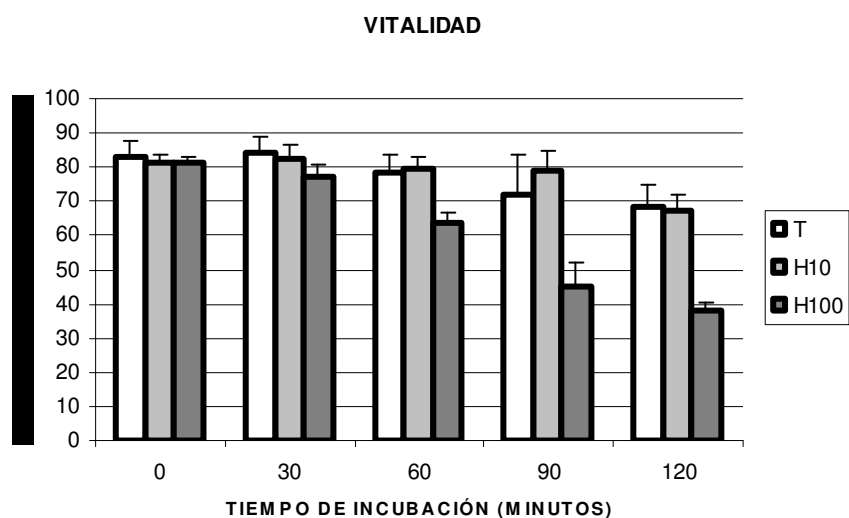


Figura 29. **Vitalidad de los espermatozoides incubados en CM a lo largo de 120 minutos en presencia de diferentes concentraciones de heparina.** T: testigo, H10: 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, H100: 100 $\mu\text{g/ml}$ de heparina. Cada valor representa el promedio de 4 replicaciones en diferentes animales \pm DE (se evaluaron 200 espermatozoides por cada experimento).

2.2 Efecto de la heparina sobre espermatozoides en condiciones capacitantes y no capacitantes

Con el fin de investigar el efecto de la heparina sobre el estado de capacitación, se usaron la tinción CTC y el Ionóforo de calcio A23187 como inductor de la reacción acrosómica, en diferentes medios de incubación.

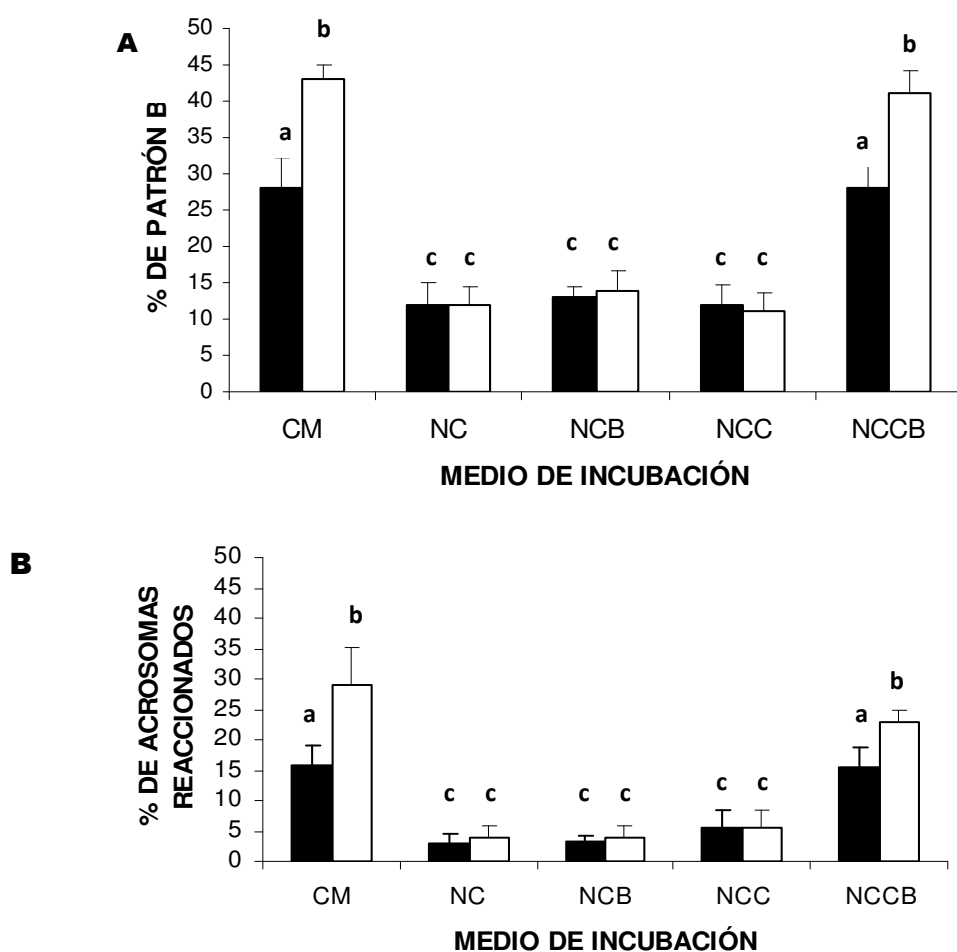


Figura 30. **Efecto de la heparina sobre la capacitación espermática en diferentes medios de incubación.** Los espermatozoides fueron incubados durante 120 minutos a 39°C en diferentes condiciones: **(CM)** medio capacitante (TALP), **(NC)** medio no capacitante CM sin CaCl_2 , NaHCO_3 ni BSA, **(NCC)** NC + CaCl_2 , **(NCB)** NC + NaHCO_3 , **(NCCB)** NC + CaCl_2 + NaHCO_3 . Sin heparina (barras negras), con 10 $\mu\text{g/ml}$ heparina (barras blancas). Cada punto representa el promedio \pm DE de 6 animales, 200 células contadas por animal. (a, b, c) las mismas letras representan diferencias no significativas ($p > 0,05$), letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0,05$). **(A)** Porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B) de acuerdo con la tinción con clortetraciclina. **(B)** Porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados por su habilidad de experimentar una reacción acrosómica inducida por ionóforo de calcio A23187 y detectada mediante la tinción Wells & Awa.

Como se observa en la figura 30-A, los patrones de CTC en células incubadas en medios no capacitantes, no variaron significativamente luego de 120 minutos de incubación, independientemente de la presencia de Ca^{++} y HCO_3^- ($p > 0,05$). La presencia de heparina en el medio no afectó los patrones de CTC en ningún caso y el porcentaje de patrón B fue similar en presencia o ausencia de la misma ($p > 0,05$).

Los patrones de CTC en espermatozoides incubados en los medios CM y NC conteniendo ambos Ca^{++} y HCO_3^- (NCCB, sin BSA), fueron similares (Fig. 30-A), y presentaron una proporción significativamente más alta de patrón B que todos los otros medios utilizados ($p < 0,001$). En ambos medios, la proporción de patrón B fue significativamente más alta en presencia de heparina ($p < 0,001$) (Figura 30-A).

La capacidad de los espermatozoides de experimentar la RA luego de la exposición a ionóforo de calcio A23187 se muestra en la figura 30-B. Las diferencias entre los valores de RA medidos antes y después del tratamiento fueron similares cuando el Ca^{++} o el HCO_3^- estuvieron ausentes, independientemente de la presencia de heparina. En CM y NCCB, el porcentaje de espermatozoides capacitados deducido fue significativamente más alto ($p < 0,001$), y coherente con los valores usualmente hallados en la capacitación de espermatozoides de cerdo. Se observó un incremento significativo en presencia de heparina ($p < 0,05$) para ambos medios de incubación.

Adicionalmente, en MC con heparina el porcentaje de espermatozoides capacitados fue significativamente más alto que en todos los demás tratamientos ($p < 0,05$). La viabilidad espermática evaluada mediante la tinción eosina-nigrosina fue de alrededor del 70 % al final del experimento (no se muestra).

2.3 Efecto de la heparina sobre la Reacción Acrosómica

En los experimentos anteriores se observó un aumento en el número de espermatozoides reaccionados en los medios de capacitación suplementados con heparina, por lo que se evaluó la posible participación de la misma en la reacción acrosómica, comparando su acción con la de un inductor específico como el ionóforo de calcio. Luego de la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes, se separaron las muestras en cuatro alícuotas a las que se adicionó heparina (CM+H), ionóforo (CM+I) y ambos (CM+H+I), respectivamente, dejando un testigo (CM). Las muestras se incubaron luego durante 15 minutos adicionales, evaluándose el estado del acrosoma con la tinción Wells Awa. El agregado de heparina en el medio de capacitación, no arrojó diferencias significativas con los valores de reacción acrosómica observados sin heparina. Cuando se adicionó ionoforo, los valores de reacción acrosómica presentaron diferencias significativas con respecto al testigo ($p \leq 0,05$) coincidiendo con los resultados habituales observados en porcinos, valores que no variaron significativamente cuando se agregó una combinación de ionóforo y heparina a la suspensión de espermatozoides capacitados (Tabla 2). Esto indicaría que el aumento de los espermatozoides reaccionados

observado estaría relacionado más con una respuesta espontánea de los espermatozoides totalmente capacitados que con un efecto directo de la heparina.

Tabla 2: **Efecto de la heparina sobre la reacción acrosómica.**

Medio	% RA	DE
CM	7,2	1,7
CM + H	8,7	1,1
CM + I	19,6 *	2,3
CM + H + I	18,3 *	3,1

Espermatozoides reaccionados luego de su capacitación y posterior incubación en TALP durante 15 minutos adicionales con 10 µg/ml heparina (**H**) y/o 10 µM ionóforo de calcio A23187 (**I**). La suspensión de espermatozoides fue incubada previamente para su capacitación en TALP (CM) durante 120 minutos y el número de espermatozoides reaccionados fue evaluado mediante la tinción Wells & Awa antes y después del tratamiento. Cada valor de espermatozoides reaccionados deriva de restar aquellos reaccionados antes del tratamiento y representa el promedio de 8 repeticiones \pm DE, con un mínimo de 200 espermatozoides contados por preparado. (*) indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al control.

2.4 Efecto de la heparina sobre la fosforilación de proteínas

Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes en presencia o ausencia de heparina y la fosforilación en tirosina evaluada como se describe en el punto 8.4. Luego de los 60 minutos de incubación, se detectó claramente la fosforilación de la proteína p32 sólo en las muestras que no contenían heparina. Los resultados fueron similares a los 120 minutos de incubación (Figura 31).

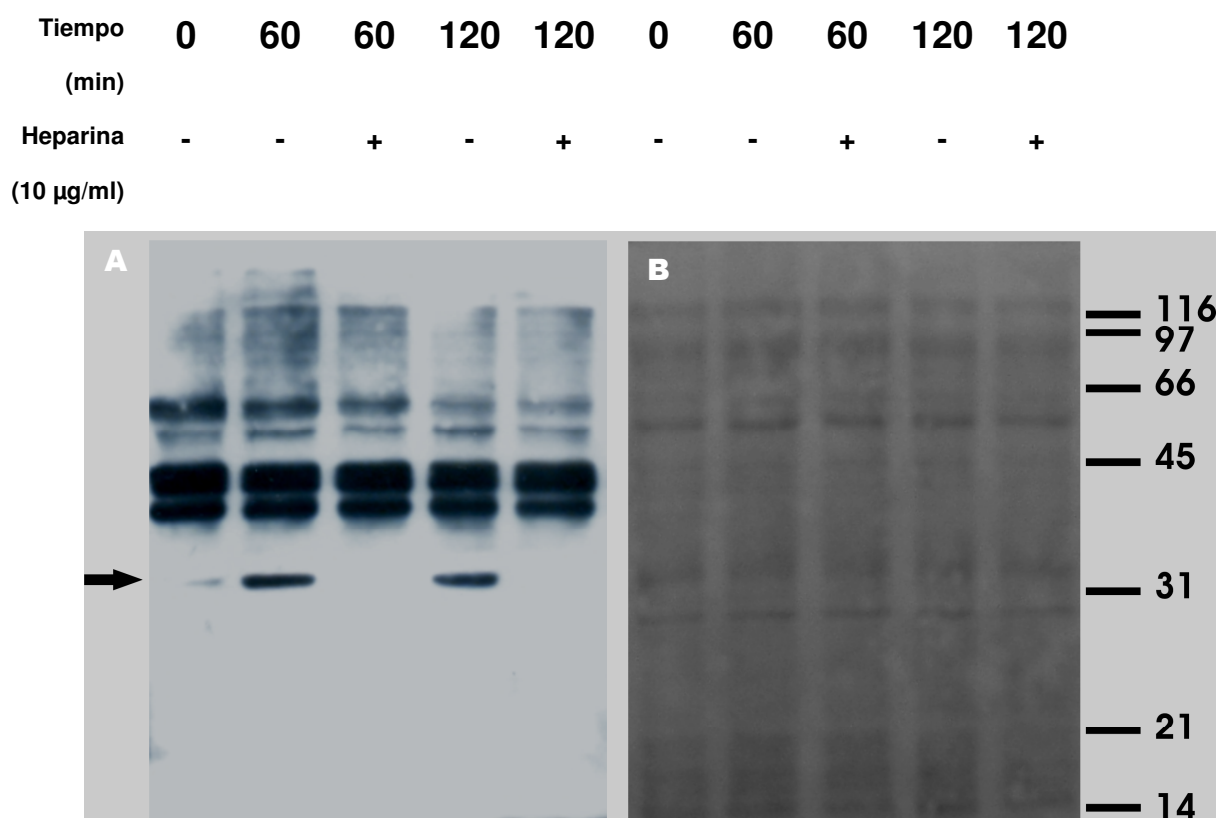


Figura 31. **Efecto de la heparina sobre la fosforilación de proteínas en espermatozoides de cerdo.** Los espermatozoides (2×10^7 /ml) fueron incubados en medio capacitante (TALP) hasta los 120 minutos con 10 µg/ml de heparina. Se sembraron 3×10^6 espermatozoides por calle. **A-** fosforilación en tirosina, **B-** proteínas teñidas con colorante rojo Ponceau. Los marcadores de peso molecular están indicados a la derecha y la proteína p32 a la izquierda, con una flecha. Este experimento fue realizado 6 veces utilizando muestras de diferentes animales. Se muestra una imagen representativa.

2.5 Efecto de la heparina sobre la interaccion espermatozoide-Zona pelucida

Se obtuvo ZP a partir de ovarios de cerdo hembra (Dumbar y Raynor, 1980; Hedrick y Wardrip, 1986) y el método del cubreobjetos cubierto de ZP (Richardson y col., 1991), se utilizó con el fin de evidenciar el efecto de la heparina sobre la unión de los espermatozoides a ZP.

Cuando se adicionaron espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes y en presencia de heparina a los cubreobjetos, el número de espermatozoides unidos fue significativamente menor comparado con aquellos incubados en ausencia de heparina, a los 30 minutos de incubación, y las diferencias aumentaron a los 60 minutos ($p < 0,0001$) (Tabla 3). En los cubreobjetos no tratados, el número de espermatozoides unidos fue mínimo y no varió significativamente a lo largo de todo el proceso de incubación, independientemente de la presencia de heparina.

Tabla 3. **Unión de espermatozoides a cubreobjetos tratados y no tratados con ZP en presencia o ausencia de heparina.**

	Cubreobjetos tratados con ZP		Cubreobjetos no tratados con ZP	
	H0	H10	H0	H 10
Período de incubación (min)				
15	3,9 ± 0,6 a	3,5 ± 1,8 a	3,3 ± 0,1 a	2,7 ± 1,0 a
30	18,8 ± 0,6 b	12,8 ± 4,1 c	4,9 ± 1,4 a	3,8 ± 1,9 a
60	30,8 ± 2,2 d	17,4 ± 4,5 b	6,2 ± 2,4 a	3,9 ± 0,3 a

Luego de la incubación de los espermatozoides como se indica en el punto 10.1 de Materiales y Métodos, durante 60 minutos a 37 °C, los cubreobjetos fueron colocados sobre portaobjetos y observados mediante microscopía de luz blanca (x400). **H0**: sin heparina, **H10**: con 10 µg/ml de heparina. El número de espermatozoides unidos correspondientes a un total de 10 campos microscopicos fue contado para cada preparado. Cada valor representa el promedio de tres replicaciones correspondientes a diferentes individuos ± DE. (**a, b, c, d**) Letras diferentes indican diferencias significativas (p< 0,0001).

3. DISCUSIÓN

La heparina es esencial para la capacitación in vitro de los espermatozoides de bovino (Chamberland y col., 2001). En cerdos, hemos observado un incremento en el número de espermatozoides capacitados (patrón B) para cada tiempo de incubación cuando la heparina está presente en los medios capacitantes, probablemente debido a su efecto acelerador sobre el metabolismo espermático, como ocurre en bovinos (Chamberland y col., 2001).

Observamos que las condiciones óptimas para promover la capacitación in vitro de espermatozoides porcinos fueron la incubación en medio capacitante suplementado con 10 mM de heparina durante 120 minutos, condiciones que mostraron un incremento en el número de espermatozoides capacitados y espermatozoides reaccionados, sin afectar la viabilidad de las células espermáticas.

La capacitación in vitro puede desencadenarse bajo varias condiciones en medios definidos que imitan la composición del fluido oviductal. Ciertos componentes como la seroalbúmina (BSA), el calcio y el bicarbonato juegan un importante rol regulatorio en la promoción de la capacitación (Harrison y col., 1996; Visconti y Kopf, 1998; Tardif y col., 2003). El influjo de Ca^{2+} está involucrado en eventos de señalización; sin embargo no es suficiente para desencadenar la capacitación en ausencia de bicarbonato. El incremento del AMPc y la posterior fosforilación de un set de proteínas durante la capacitación espermática requieren de la presencia de ambos, calcio y bicarbonato en el

medio (Visconti y Kopf, 1998; Gadella y Van Gestel, 2004), sugiriendo un efecto cooperativo entre estos dos componentes.

En este trabajo se muestra que la heparina aumenta la capacitación in vitro de los espermatozoides porcinos determinada por la tinción CTC y por la habilidad de los espermatozoides capacitados de experimentar una reacción acrosómica luego de la exposición a ionóforo de calcio. Adicionalmente, para producir la capacitación con heparina, se observó que el medio de cultivo debía contener bicarbonato y calcio, indicando que la heparina actúa sólo en condiciones capacitantes.

No se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides capacitados en CM y NCCB sin heparina y en ambos casos, estos valores aumentaron en presencia de heparina. Este dato sustenta previas indicaciones que postulan que BSA no es esencial para la capacitación in vitro de los espermatozoides porcinos (Tardif y col., 2003). Se cree que la albúmina facilita el eflujo de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Sin embargo, este eflujo de colesterol mediado por la albúmina ha sido demostrado sólo en espermatozoides de roedores y humanos (Cross, 1998).

Estudios realizados acerca de la capacitación de espermatozoides bovinos muestran que la capacitación in vitro puede ser desencadenada en medios que contienen heparina o fluido oviductal, en los cuales se cree que los agentes capacitantes activos son glicosaminoglicanos del tipo heparina. Los glicosaminoglicanos podrían promover la capacitación mediante la remoción de la superficie del espermatozoide de proteínas que también se encuentran en el

plasma seminal y estarían involucradas en la formación de una cubierta en la superficie del espermatozoide que evitaría la capacitación (Visconti y Kopf, 1998).

Teniendo en cuenta que los glicosaminoglicanos del tipo heparina son componentes del fluido oviductal en la hembra porcina (Thientai y col., 2000), se propone en este trabajo, que la heparina podría optimizar la capacitación, mediante la liberación de estos factores decapacitantes periféricos de la membrana plasmática del espermatozoide, como ocurre in vivo.

Numerosos estudios han demostrado que el bicarbonato es un efector clave de la capacitación (Harrison y col., 1996; Tardif y col., 2003). Recientemente, Gadella y Van Gestel, 2004, han establecido que solo aquellos espermatozoides que han completado su maduración funcional en el epidídimo son sensibles al bicarbonato, mientras que los espermatozoides inmaduros (los que contienen gotas citoplasmáticas) fallan en la respuesta a este desafío fisiológico. En reproductores machos de fecundidad probada, la presencia de un 14 a 20 % de gotas citoplasmáticas es considerada como normal. Por otro lado, algunos espermatozoides sufren una reacción acrosómica espontánea al ser incubados en condiciones capacitantes sin la presencia de un inductor específico de RA. Esta respuesta es atribuida generalmente a un proceso degenerativo del espermatozoide que ha completado su capacitación.

En presencia de heparina, se observó un aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados (Figura 28-C). Con el fin de evaluar la posibilidad de que la heparina pudiera afectar en forma directa el número de

espermatozoides con RA, este glicosaminoglicano fue adicionado a la suspensión de espermatozoides al final del período de incubación en CM. El porcentaje de RA no varió significativamente luego de 15 minutos de incubación en presencia de heparina lo que señala que, al menos en estas condiciones experimentales, la heparina no afecta la proporción de espermatozoides reaccionados. Este aumento de RA podría ser atribuible, entonces, a la respuesta de una subpoblación de espermatozoides inestables y totalmente capacitados.

El efecto capacitante de la heparina fue observado utilizando CTC o el inductor de reacción acrosómica ionóforo de calcio. Sin embargo, los valores absolutos obtenidos en cada caso fueron diferentes, siendo más altos para CTC. Este hecho concuerda con que CTC muestra el incremento de la fluidez de la membrana que ocurre mucho antes que el espermatozoide se encuentre en condiciones de experimentar una reacción acrosómica (Tardif y col., 1999).

In vivo, los espermatozoides porcinos se acumulan en la unión útero tubárica e istmo del oviducto de la hembra (reservorios de espermatozoides) mediante su unión a la membrana apical del epitelio (Suarez, 2002; Thienthai y col., 2004), existiendo una unión preferencial de las formas no capacitadas (Fazeli y col., 1999; Rodríguez-Martínez y col., 2001). En bovinos, la heparina y otros glicosaminoglicanos sulfatados son poderosos moduladores de esta unión de los espermatozoides a las células oviductales *in vitro* y son capaces de producir un aumento del movimiento flagelar seguido de la liberación de los espermatozoides con motilidad progresiva probablemente a través de efectos capacitantes tempranos (Talevi y Gualtieri, 2001).

Existen evidencias de la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados en el oviducto porcino y del incremento de la concentración de estos componentes en el fluido oviductal colectado en hembras de esta especie durante el inicio del estro (Thientai y col., 2000). El glicosaminoglicano no sulfatado Hialuronan ha sido recientemente detectado en los reservorios espermáticos cumpliendo diferentes roles en la fisiología del espermatozoide dependiendo del momento del ciclo sexual de la hembra (Rodríguez-Martínez y col., 2005). Sin embargo, el efecto de los GAGs sulfatados tales como la heparina en estos sitios se desconoce. Estos hallazgos sugieren que los GAGs sulfatados podrían participar en la modulación de la viabilidad espermática y la capacitación durante el transporte de espermatozoides en el oviducto. El efecto capacitante de la heparina in vitro que se muestra en este trabajo, sustenta esta hipótesis. Futuros estudios son necesarios para elucidar los cambios morfológicos y bioquímicos específicos resultantes de la acción de la heparina sobre el proceso de capacitación de los espermatozoides en la especie porcina.

La unión de espermatozoides a ZP en presencia o ausencia de heparina, se evaluó mediante la técnica de Richardson y col., (1991) o técnica del cubreobjetos, como se detalla en la sección 10.1. Se observó que en presencia de heparina, la unión a ZP fue significativamente menor. Este resultado se podría explicar considerando el hecho de que la Zona pelúcida contiene cierto número de dominios polisulfatados que posiblemente competirían con la heparina (Tatemoto y col., 2005). Teniendo en cuenta además, que en presencia de heparina la fosforilación de p32 disminuye, se podría pensar que

la unión de heparina al acrosoma impediría la culminación del proceso de capacitación de algunas células espermáticas considerando que la fosforilación de proteínas espermáticas en tirosina muestra sólo alguna etapa del proceso de capacitación pero no su finalización (Piehler y col., 2006). Por otro lado, Dubé y col. (2005), observaron mediante inmunofluorescencia indirecta que muestras de espermatozoides a los que se indujo a experimentar la RA mediante el uso de ionóforo perdieron la señal de fluorescencia de p32 sugiriendo que esta proteína podría ser liberada o degradada proteolíticamente durante la reacción acrosómica y así no ser detectada por el anticuerpo.

Como se indicó antes, en este trabajo se observó un aumento en el porcentaje de reacción acrosómica cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia de heparina, hecho que también podría explicar la mencionada pérdida de la señal de fosforilación de p32 cuando los medios de capacitación contenían heparina.

Durante el período periovulatorio en la hembra porcina, sólo un número restringido de espermatozoides se libera gradualmente a partir de los reservorios oviductales alcanzando el sitio de fecundación en la unión ampolla istmo (UAI), hecho que contribuye a la existencia de una proporción 1:1 espermatozoide/ovocito en el momento de la fecundación in vivo, reduciendo las chances de polispermia (Hunter, 1996).

La mayoría de las HBP permanecen unidas al espermatozoide después de la capacitación, interviniendo algunas de ellas, como AWN-1 y DQH, en la unión primaria del espermatozoide a la ZP (Dostalová y col., 1995; Monásková y col., 2007; Töpfer-Petersen y col., 2008).

De acuerdo con lo observado en este trabajo, la heparina inhibe la unión a ZP, probablemente compitiendo por los sitios de unión del espermatozoide a la misma, hecho que sugiere que los glucosaminoglicanos de su tipo podrían estar implicados en la preselección espermática y así contribuir a la prevención de la polispermia.

CAPÍTULO 3

DISTRIBUCIÓN Y DINÁMICA DE LOS SITIOS DE UNIÓN A HEPARINA EN EL ESPERMATOZOIDE PORCINO. ¿UN NUEVO INDICADOR DE CAPACITACIÓN?

1. INTRODUCCIÓN

Las espermadhesinas constituyen el componente principal del plasma seminal en porcinos. Este grupo comprende 5 proteínas, con sus variantes, que se clasifican, de acuerdo con su secuencia y actividad biológica como AWN-1 y 2, AQN-1, 2 y 3, DQH, PSP-I y PSP-II, de las cuales AQN-1, AQN-3, AWN-1, AWN-2 y DQH pertenecen al grupo de las proteínas de unión a heparina (HBP) (Sanz y col., 1993). Las HBP han sido identificadas también como moléculas asociadas a la superficie del espermatozoide que interactúan con las glicoproteínas y los lípidos que componen su membrana plasmática (Jonáková y col., 1998). Existen fuertes evidencias que indican que la capacitación implica una remodelación de la arquitectura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide (Harrison y col., 1996; Flesch y col., 2001; Cross, 2004; Gadella y Van Gestel, 2004; Van Gestel y col., 2005), con la consecuente redistribución de las proteínas de la superficie (Gadella y col., 2008); por lo que es probable la relocalización de las HBP durante dicho proceso.

En la actualidad existen muchos métodos de evaluación seminal tales como los análisis de la motilidad asistida por computadora (sistemas CASA), el test de resistencia osmótica, las evaluaciones de la integridad de la membrana mediante el uso de tinciones fluorescentes impermeables, lectinas y

anticuerpos, entre otros, métodos que suelen ser altamente cuantitativos, sensibles, sus resultados presentan alta repetitividad y algunos utilizados rutinariamente en la evaluación de semen para comercialización en cerdos y toros (Christensen y col., 2004, 2005). Sin embargo, el problema sigue siendo la falla en encontrar fuertes correlaciones entre ellos y la fecundidad in vivo (Gadea y col., 2004; Petrunkina y col., 2007).

Trabajos en bovinos están focalizando la evaluación de la calidad seminal en la medición de posibles indicadores de fecundidad tales como algunas de las proteínas del plasma seminal o proteínas de unión a heparina (HBP) (Bellin y col., 1988, 1996; Sprott y col., 2000). En esta especie, dichas proteínas se han identificado como capaces de influenciar la capacidad fecundante de los espermatozoides mostrando distintos niveles de fecundidad de acuerdo con su concentración (Bellin y col., 1988, 1996; Parent y col., 1999; Killian y col., 1993; Sprott y col., 2000; Rodriguez-Martinez, 2003; Moura y col., 2006). En cerdos, el estudio del posible rol de las HBP como indicadoras de fecundidad no ha sido establecido.

En este trabajo se evaluó la distribución de las proteínas de unión a heparina (HBP) en la membrana del espermatozoide porcino y se procedió a la detección de posibles diferencias en la unión a heparina de estas proteínas en muestras de espermatozoides de animales con diferentes grados de Fecundidad o Tasa de Parto, basando las diferencias de dicha fecundidad, en datos productivos recolectados en el criadero a lo largo de toda la vida reproductiva de los individuos.

2. RESULTADOS

2.1 Detección y caracterización de la unión de la heparina al espermatozoide

2.1.1 En espermatozoides sin tratar

Para verificar la unión de la heparina a espermatozoides se procedió a la incubación de los mismos con heparina biotinilada y posterior revelado con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sanz y col., 1993). Utilizando la misma técnica, se determinó la especificidad de la unión por inhibición competitiva agregando heparina no biotinilada. En ambos casos, se evaluó el resultado luego de la siembra de los espermatozoides en una membrana apropiada, por observación colorimétrica de la actividad peroxidasa. Como se observa en la figura 32, los espermatozoides muestran unión detectable a heparina biotinilada. Cuando fueron tratados con heparina biotinilada y no biotinilada, no se observó reacción, mostrando que la unión de la heparina es específica (Figura 32).

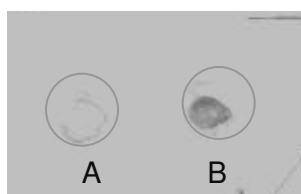


Figura 32. **Detección de la unión a heparina en espermatozoides enteros.** Los espermatozoides fueron sembrados en membrana de nitrocelulosa con posterior evaluación colorimétrica de la actividad peroxidasa. **A:** tratados con heparina biotinilada y sin biotinilar 100 veces más concentrada. **B:** tratados con heparina biotinilada.

2.1.2 En espermatozoides con diferente estado fisiológico (capacitados y reaccionados)

Luego de la obtención de espermatozoides capacitados y reaccionados, por incubación en medio TALP y mediante incubación con Ionóforo de Calcio A23187, respectivamente, se procedió de manera similar al punto anterior (incubación con heparina biotinilada y posterior revelado con streptavidina conjugada con peroxidasa). Se observó que la afinidad por la heparina fue mayor en los espermatozoides enteros y capacitados y una aparente disminución de la misma en los espermatozoides reaccionados (Figura 33).

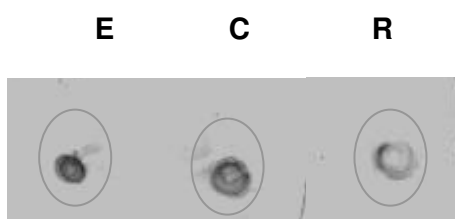


Figura 33. **Detección de la unión a heparina en espermatozoides enteros. (E), capacitados (C) y reaccionados (R).** Los espermatozoides fueron sembrados en membrana de nitrocelulosa luego de la incubación con heparina biotinilada y revelado con streptavidina-peroxidasa.

2.2 Localización de HBP en espermatozoides de cerdo por fraccionamiento subcelular

Se obtuvieron membranas periacrosomales de espermatozoides separando inicialmente las membranas plasmática y acrosomal externa como se indica en el punto 8.5.2.1 probando 2 técnicas: resuspensión e incubación en medio

hipotónico de Fructosa/ Citrato de Sodio en diferentes tiempos e Incubación con Ionóforo de Calcio A23187 en diferentes concentraciones durante 60 minutos en medio TALP, evaluándose la pérdida acrosomal por tinción de Wells & Awa (Tabla 4).

Tabla 4. **Evaluación del estado de ruptura acrosomal en diferentes condiciones.**

Tiempo de Incubación (minutos)	Medio				
	Control	(I) 5 μ M	(I) 10 μ M	(I) 20 μ M	FC40
0	20,8 \pm 2,9	21,0 \pm 1,5	21,6 \pm 1,1	20,1 \pm 2,1	21,8 \pm 2,1
30	21,8 \pm 2,3	36,4 \pm 1,9	54,2 \pm 3,1	54,6 \pm 2,4	34,0 \pm 3,6
60	25,8 \pm 2,7	50,0 \pm 1,4	66,6 \pm 2,7	61,6 \pm 2,3	64,0 \pm 2,9

Los espermatozoides fueron tratados con ionóforo de calcio A23187 (**I**) (0, 5, 10 y 20 μ M) y con solución hipoosmótica de Fructosa / Citrato de Sodio 40 mosm/l (**FC 40**) en tres tiempos de incubación (0, 30 y 60 minutos) y el % de RA determinado por la técnica Wells Awa. Los valores corresponden al recuento de 2000 células (5 réplicas, 2 extendidos/muestra, 200 células/extendido) y se expresan como media \pm DE. n=5.

Como se destaca en la tabla 4, las mejores condiciones de ruptura fueron de 60 minutos de incubación tanto para el ionóforo 10 μ M como para (FC40). Teniendo en cuenta la posible liberación de HBP de la membrana por acción

del ionóforo, se decidió utilizar el método de choque hipoosmótico FC40 para los estudios posteriores.

Las membrana periacrosomales espermáticas obtenidas como se describe en el punto 8.5.2.2 y las proteínas eluídas a partir de ellas tratándolas con una solución de alta fuerza iónica (S3) seguido de detergente (S4), fueron utilizadas para determinar la presencia de HBP mediante un análisis dot blot con heparina biotinilada seguida de una detección colorimétrica.

Las proteínas de unión a heparina fueron detectadas en los extractos S2, S3 y S4 correspondientes a proteínas extraíbles mediante el uso de una solución de baja fuerza iónica o al contenido acrosomal, proteínas extraíbles por acción de una solución de alta fuerza iónica y por detergentes a partir de las membranas periacrosomales, respectivamente.

No se detectó la presencia de HBP en la fracción P4 que corresponde a las membranas periacrosomales luego de ambas extracciones. Se utilizó BSA como control, no observándose ninguna señal (Figura 34).

Se realizaron además, controles de especificidad mediante competición con heparina no biotinilada, no observándose señales detectables (no se muestra).

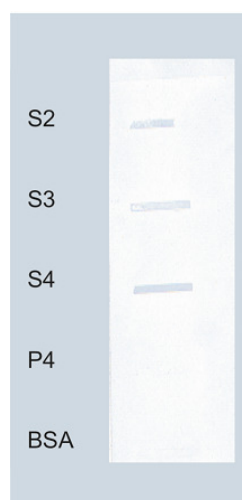


Figura 34. **Detección de HBP en distintas fracciones de membrana de espermatozoides.** Fracciones de membrana espermática fueron obtenidas por fraccionamiento subcelular, marcadas con heparina biotinilada y luego incubadas con streptavidina/ peroxidasa. S2: proteínas extraíbles con soluciones de baja fuerza iónica o contenido acrosomal, S3: proteínas extraíbles con soluciones de alta fuerza iónica, S4: proteínas integrales solubles en detergente y P4: pellet final.

2.3 Localización de compuestos que unen heparina sobre el espermatozoide

La unión a heparina de los espermatozoides de cerdo fue analizada por microscopía de fluorescencia indirecta de espermatozoides incubados con heparina biotinilada y posteriormente con estreptavidina-FITC. Como se observa en la figura 35-A, en espermatozoides no incubados, la heparina se unió principalmente a la región posacrosomal de la cabeza del espermatozoide (llamado patrón A). Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes, la unión de la heparina se observó en la región acrosomal en la mayoría de los espermatozoides (llamada patrón B, figura 35-B) mientras otros mantuvieron la tinción en la región posacrosomal.

Luego de los 60 minutos de incubación en MC, hubo más espermatozoides mostrando patrón B comparados con los no incubados (tiempo 0) ($p < 0,001$) y este valor no varió a los 120 minutos (Figura 35-C y D y 36-A).

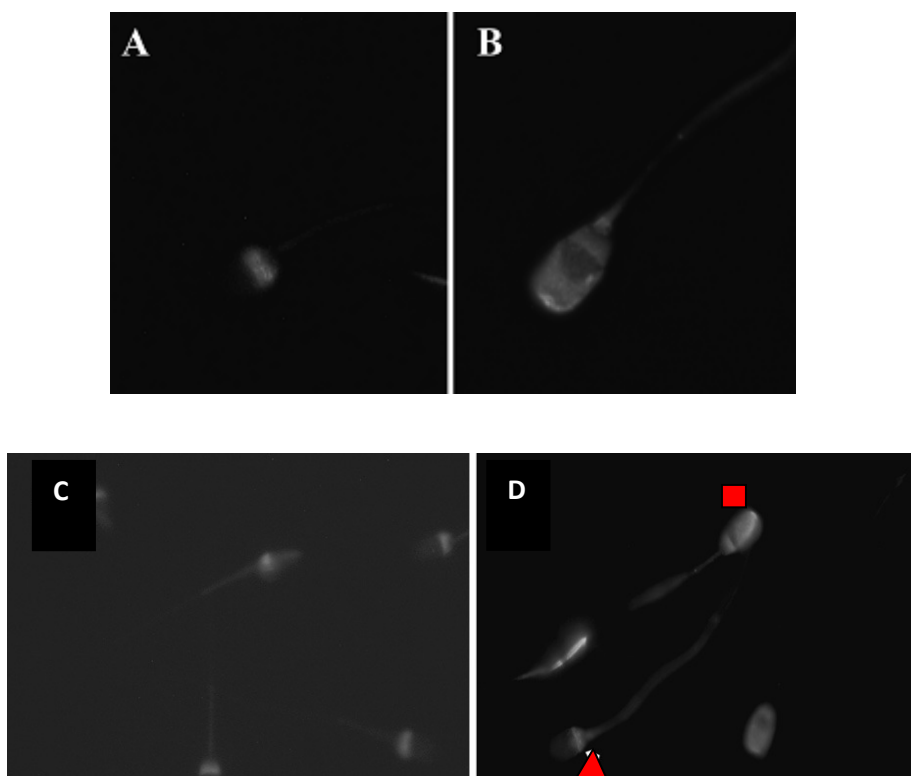


Figura 35. **Detección de la unión de la heparina mediante microscopía de fluorescencia.** Patrones fluorescentes de unión de heparina a espermatozoides de cerdo incubados con heparina biotinilada ($100\mu\text{g/ml}$) revelados utilizando estreptavidina-FITC. (**A y C**) en espermatozoides sin incubación previa, la tinción se limitó a la región posacrosomal (patrón A) (X400), (**B y D**) espermatozoides incubados en condiciones capacitantes en donde se observa que algunos muestran tinción en la región acrosomal (patrón B) (■) mientras otros muestran patrón A (▲). (X400).

La habilidad de los espermatozoides de experimentar una RA luego de la exposición a ionóforo de calcio A23187 se utilizó para confirmar la ocurrencia del proceso de capacitación a lo largo del experimento. El porcentaje de espermatozoides reaccionados (capacitados) fue mayor luego de los 60

minutos de incubación con ionóforo ($p<0,001$), y no varió entre los 60 y 120 minutos de incubación (Figura 36-B). Este aumento es concomitante con el del patrón B de unión a heparina.

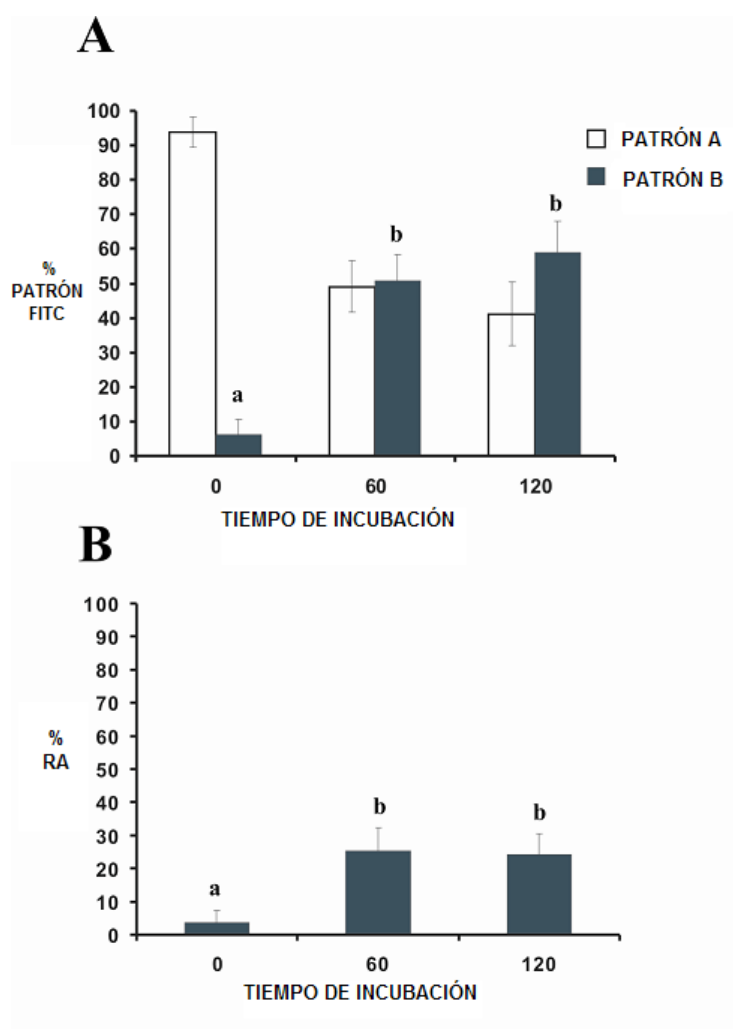


Figura 35. **Cambios a través del tiempo en el porcentaje de espermatozoides porcinos mostrando patrones A y B de unión a heparina y en el número de espermatozoides reaccionados con ionóforo de calcio A23187.** Los espermatozoides fueron incubados en medio capacitante TALP durante 120 minutos a 37°C. **(A)** Porcentaje de patrones A y B. **(B)** Porcentaje de espermatozoides capacitados determinados mediante su habilidad de experimentar una reacción acrosómica inducida por ionóforo de calcio y detectada mediante la tinción Wells & Awa. Se contaron 200 espermatozoides por cada experimento. Cada valor representa el promedio \pm DE ($n=8$). Los valores con letras diferentes (a y b) son significativamente diferentes ($p<0,001$).

Cuando los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones no capacitantes, el porcentaje de patrón B para NC y PBS, no varió significativamente a los 60 y 120 minutos de incubación pero fue diferente para aquellos espermatozoides que fueron incubados bajo condiciones capacitantes (TALP) para los mismos tiempos de incubación ($p < 0,0001$) (Tabla 5). Los valores observados en ambos medios no capacitantes no mostraron una diferencia significativa con respecto a los espermatozoides no incubados (tiempo 0).

Tabla 5. Porcentaje de patrón B en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes y no capacitantes.

Tiempo de Incubacion (minutos)	Medios		
	TALP	NC	PBS
0	5,3 ± 1,5 a	6,6 ± 3,0 a	4,3 ± 2,0 a
60	48,6 ± 5,5 b	11,0 ± 1,0 a	4,6 ± 0,5 a
120	54,0 ± 6,0 b	9,0 ± 2,6 a	5,6 ± 3,7 a

Porcentaje de espermatozoides mostrando patrón B luego de ser incubados en el tiempo que se indica bajo condiciones capacitantes (TALP) y no capacitantes (NC y PBS). Cada valor representa el promedio de tres replicaciones en diferentes animales ± DE y un total de 200 espermatozoides contados en cada experimento. (**a,b**) letras diferentes denotan diferencias significativas en el porcentaje de patrón B de espermatozoides incubados en medio no capacitante en relación con el control ($p < 0,0001$).

No se encontraron diferencias significativas ($p>0,0001$) en los patrones de unión a heparina cuando espermatozoides no capacitados fueron permeabilizados con metanol o Triton X-100 al 0,2 o 2% de concentración antes de la detección de HBP (Tabla 6). En todos los casos, los valores fueron similares a los obtenidos a partir de espermatozoides no capacitados y no permeabilizados.

Tabla 6. **Porcentaje de patrón A en espermatozoides permeabilizados.**

	Medios			
	PBS	Metanol	Tritón 0,2%	Triton 2 %
% Patrón A	98,6 \pm 0,5	94,0 \pm 2,6	96,3 \pm 3,7	96,0 \pm 2,6

Porcentaje de espermatozoides no incubados mostrando el patrón A luego de su permeabilización en diferentes condiciones como se describe en Materiales y Métodos. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de patrón A en relación con el control (PBS) ($p<0,0001$). Cada valor representa el promedio de tres replicaciones de diferentes verracos \pm DE. Se contaron 200 espermatozoides en cada experimento.

Cuando se adicionó heparina no biotinilada junto con la heparina unida a FITC como control de especificidad, no se detectó fluorescencia en ningún caso (Figura 37).

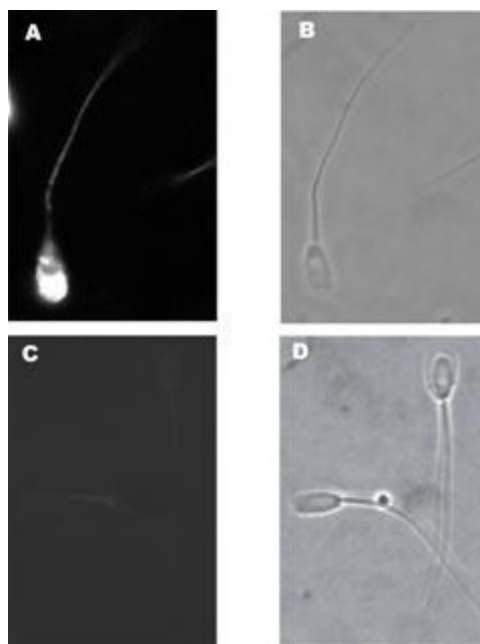


Figura 37. **Especificidad de la unión de la heparina al espermatozoide.** **A, B:** Se incubaron los espermatozoides con heparina biotinilada (100 $\mu\text{g/ml}$) y los sitio de unión se revelaron utilizando estreptavidina-FITC. **C, D:** El mismo experimento fue desarrollado en presencia de 1 mg/ml de heparina no marcada. **A, C:** imágenes fluorescentes. **B, D:** microfotografías con luz visible. (X1000).

2.4 Las HBP como indicadoras de fecundidad en la especie porcina

En este estudio se procedió a clasificar inicialmente a un grupo de reproductores porcinos, cuyos parámetros de calidad seminal no mostraban diferencias en relación con los valores habituales de normalidad

preestablecidos para la especie porcina, en dos grupos (I y II) en función de diferencias en cuanto a su Fecundidad o Tasa de Parto. Esta diferencia se sustentó en registros del número de hembras que parieron en relación a las inseminadas con semen de cada individuo, perteneciendo al grupo I los individuos con una tasa de fecundidad mayor o igual al 70 % y al grupo II, individuos con una tasa menor al 70 % (Los valores para cada verraco se detallan en la tabla 7).

Tabla 7: **Valores de Tasa de Parto**

Verraco	cerdas paridas	cerdas servidas	tasa de parto (%)
grupo I			
A1	598	748	79,9
A2	479	672	71,2
A3	489	620	78,9
A4	461	646	71,3
grupo II			
B1	301	456	66
B2	67	107	62,6
B3	81	123	65,8
B4	87	114	60,8

Muestras de semen de cada individuo fueron evaluadas mediante microscopía de fluorescencia indirecta para sitios de unión a heparina luego de ser incubados en condiciones capacitantes, como se detalla en el punto 9.1 (Figura 38).

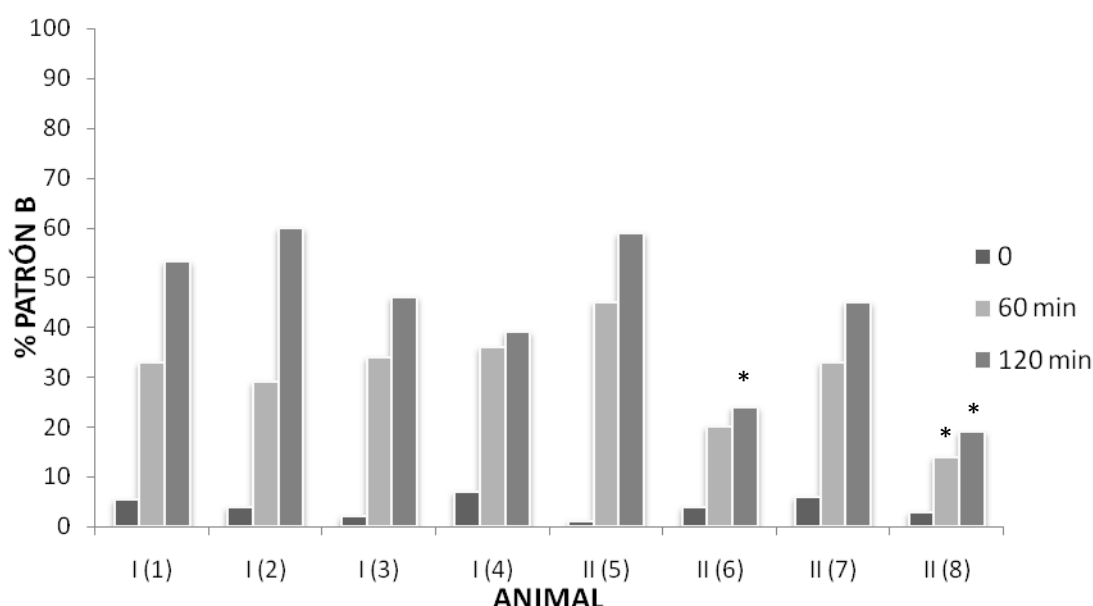


Figura 38. **Porcentaje de patrón B en espermatozoides de reproductores porcinos con diferente Fecundidad o Tasa de Parto.** Muestras de semen de 8 verracos clasificados como grupo I y II de acuerdo con su fecundidad o Tasa de Parto, como se detalla en el punto 9.2 y evaluadas mediante la técnica de microscopía de fluorescencia indirecta con heparina biotinilada descrita en el punto 9.1. Cada valor corresponde al porcentaje de patrón B de unión a heparina en distintos tiempos de incubación, para cada individuo. Los animales se nombran de acuerdo al grupo al que pertenecen y, entre paréntesis, el número que los identifica. (*) Indica diferencias significativas ($p < 0,001$).

Se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de espermatozoides que muestran patrón B de fluorescencia en 2 animales pertenecientes al grupo II, los que muestran un porcentaje significativamente menor de fluorescencia en la región acrosomal en todos los tiempos de incubación testados ($p < 0,001$) en relación con los otros individuos analizados.

3. DISCUSIÓN

Se probó la unión de la heparina al espermatozoide, localizándola mediante microscopía de fluorescencia indirecta. En espermatozoides no capacitados la heparina se unió principalmente a la región posacrosomal (Figura 35-A) independientemente de la permeabilización previa, sugiriendo que la heparina se une a componentes en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide que están expuestos solamente en la región posacrosomal. Este resultado concuerda con la presencia de HBP en la fracción S2 obtenida por fraccionamiento subcelular (Figura 34), la que contiene proteínas unidas débilmente a la superficie, entre otras.

La arquitectura de la membrana plasmática juega un rol importante en el proceso de capacitación de la célula espermática. La redistribución de lípidos y proteínas en la membrana plasmática de la región de la cabeza del espermatozoide durante la capacitación ocurre en muchas especies, incluido el cerdo (Gadella y col., 1995, 2008; Van Gestel y col., 2005; Girouard y col., 2008), y algunas espermadhesinas se liberan del espermatozoide durante o luego de la capacitación (Sanz y col., 1993; Dostálova y col., 1994; Centurion y col., 2003). Así, resulta interesante analizar la dinámica de la distribución de los sitios de unión a heparina en el espermatozoide experimentando la capacitación. Cuando la unión de la heparina fue evaluada en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, se observaron dos patrones. El patrón A (Figura 35-A) predominó en espermatozoides no incubados y en espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes. El patrón B

(Figura 35-B), en cambio, se encontró en una proporción incrementada significativamente en relación con el transcurso del tiempo de incubación en condiciones capacitantes (Figura 36-A) y podría estar relacionado con la ocurrencia de la capacitación. La misma fue evaluada mediante la habilidad de los espermatozoides de experimentar una RA en presencia de ionóforo de calcio A23187 (Figura 36-B). Los valores absolutos de espermatozoides capacitados obtenidos a partir de la evaluación de la habilidad de los espermatozoides de experimentar una reacción acrosómica en presencia de ionóforo son consistentes con los valores hallados usualmente en cerdo y son menores que la proporción de espermatozoides que mostraron el patrón B. Esta diferencia puede explicarse considerando a la remodelación de la superficie del espermatozoide como uno de los eventos tempranos del proceso de capacitación (Gadella y col., 1995, 2008), mientras que la habilidad de producir una reacción acrosómica se adquiere más tarde a lo largo del proceso. Sin embargo, la posibilidad de que algunos espermatozoides pudieran haber iniciado los primeros pasos de la reacción acrosómica, exponiendo componentes que unen a la heparina biotinilada en forma específica, no puede ser descartada.

La localización topográfica de los sitios de unión a heparina en la región posacrosomal de espermatozoides no tratados y la modificación de esa topología en relación con los cambios del estado fisiológico del espermatozoide constituyen una nueva evidencia del reordenamiento molecular que experimentan los espermatozoides durante el proceso de capacitación. La evaluación de los patrones de tinción de HBP podría constituir un método

relativamente simple para la detección de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide porcino y una alternativa al uso de las técnicas de CTC e ionóforo de calcio, debido a que reflejaría otros eventos relacionados con el proceso de capacitación.

La redistribución del fosfolípido aniónico seminolípido (el principal fosfolípido de la membrana plasmática de los espermatozoides de mamífero) desde la región acrosomal hacia el área posacrosomal durante la capacitación fue demostrado por Gadella y col. (1995). Ellos sugieren que este movimiento de lípido constituye el primer evento durante el proceso de capacitación. En este estudio, la heparina (otro componente aniónico) se une preferentemente a la región posacrosomal en espermatozoides no capacitados y a la región acrosomal en los espermatozoides capacitados (Figura 35). Este cambio podría estar relacionado con la redistribución de HBP, con la posible contribución de la redistribución de los fosfolípidos aniónicos.

Alternativamente, este resultado puede deberse a la exposición de HBP durante la capacitación. Töpfer-Petersen y col. (2008) han propuesto un modelo en el cual algunas espermadhesinas, tales como AWN-1, AQN-3 y DQH (todas pertenecientes a la familia de proteínas que se unen a heparina), interactúan con los fosfolípidos de la membrana permaneciendo unidas al espermatozoide luego de la capacitación. Estas espermadhesinas estarían involucradas en la unión a ZP como receptores primarios (Dostàlovà y col., 1995; Van Gestel y col., 2007; Monásková y col., 2007). El resto, las formas agregadas de espermadhesinas pertenecientes al grupo de las proteínas que no se unen a heparina (PSP-I y PSP-II), que son algunas de las proteínas que

se liberan del espermatozoide durante la capacitación, estarían relacionadas con la protección del espermatozoide evitando una reacción acrosómica prematura indeseable (Centurión y col., 2003).

Recientemente, AQN-3 ha sido identificada también como una proteína asociada a la membrana del espermatozoide que está presente en microdominios que emergen durante la capacitación in vitro en el área de la proyección apical de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Boerke y col., 2008). Es probable que esta espermadhesina, que se encuentra enmascarada en los espermatozoides no capacitados y emerge durante la capacitación, sea la responsable de los diferentes patrones de unión a heparina detectados en este trabajo. La detección de HBP mediante el fraccionamiento subcelular (Figura 34) como componentes de las membranas periacrosomales en forma de proteínas periféricas (S3) y fuertemente asociadas o integrales (S4) a partir de espermatozoides no capacitados, está también en concordancia con esta hipótesis.

Cuando se analizó semen proveniente de individuos con parámetros de calidad seminal normales y diferente fecundidad (clasificados en grupos I y II que se corresponden a tasas de fecundidad mayor o menor al 70%, respectivamente) mediante microscopía de fluorescencia indirecta con heparina biotinilada como se detalla en el punto 9.1, se observó que los espermatozoides capacitados de dos 2 animales del grupo II mostraban porcentajes menores de patrón B (Figura 38).

En este trabajo se vio que la heparina se une en forma diferencial al espermatozoide de acuerdo con su estado fisiológico, mostrando, mediante diferentes patrones fluorescentes, que durante el proceso de capacitación ocurre una remodelación de la arquitectura de la membrana espermática y una exposición o redistribución de ciertas moléculas (HBP) en la región acrosomal. Por otro lado, se observó que la heparina inhibe la unión primaria a la zona pelúcida in vitro, lo que podría indicar que la misma comparte con la ZP los sitios de unión al espermatozoide. Ambas observaciones posicionan a la heparina como posible indicadora de la presencia de proteínas que participan en el proceso de fecundación, específicamente en aquellas involucradas en el reconocimiento inicial espermatozoide-ovocito.

Tal como se menciona anteriormente, proteínas de unión a heparina (AWN-1, AQN-3 y DQH) son retenidas en la membrana espermática luego de la capacitación (Töpfer-Petersen y col., 2008) e intervienen como receptores primarios en la unión ovocito-ZP (Dostàlovà y col., 1995; Van Gestel, 2007; Monásková y col., 2007) por lo que una disminución en la densidad de estas proteínas sobre la membrana del espermatozoide porcino podría estar reflejada en la disminución en el porcentaje de espermatozoides que unen heparina en la región acrosomal luego de capacitados (patrón B) observada en algunos individuos, como se muestra en este trabajo. En función de los valores de fecundidad (hembras paridas/hembras inseminadas) inferiores observados para estos mismos animales, podría pensarse que la menor densidad o exposición de estas proteínas de unión a heparina y a ZP estaría identificando, dentro de una población de reproductores aptos para la Inseminación Artificial,

una subpoblación de individuos con menor capacidad fecundante, característica que no se refleja en los análisis comúnmente utilizados para la evaluación de la calidad del semen porcino destinado a la Inseminación Artificial. Este hallazgo podría ser de suma utilidad en aquellos establecimientos de alta producción en donde se hace necesaria la utilización de individuos con la más alta capacidad reproductiva.

RESUMEN

1. Métodos para la evaluación de la integridad estructural del acrosoma

El acrosoma almacena enzimas y proteínas cruciales para la interacción con el ovocito durante la fecundación, por lo que su evaluación resulta esencial. Las técnicas que evalúan el estado acrosomal (lectinas fluorescentes, contraste de fases, por ejemplo) no representan una alternativa accesible a los fines prácticos debido a que insumen mucho tiempo, su desarrollo es complejo o requieren de un equipo específico e insumos de alto costo que los hace inaplicables a un plan rutinario de control de calidad en los establecimientos que procesan semen porcino. Las técnicas que utilizan colorantes ofrecen una alternativa interesante tanto con fines de investigación, por su estabilidad, como con fines prácticos. Sin embargo, muy pocas de ellas han sido validadas con otras técnicas de evaluación estandarizadas.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad de la tinción Wells & Awa en detectar cambios paulatinos en la estructura acrosomal comparándola con técnicas estandarizadas como contraste de fases y Giemsa, mostrándose igualmente eficaz en dicha detección por acción de un inductor de reacción acrosómica como el ionóforo o por efecto de la conservación, lo que resulta de utilidad en los establecimientos que almacenan dosis seminales durante varios días.

Las ventajas de esta técnica de tinción con respecto a otras, son la posibilidad de utilizar un simple microscopio de campo claro y la estabilidad de los preparados que hace que puedan ser guardados y observados más tarde. Por

otro lado, su escaso tiempo de incubación y secado que favorece el mantenimiento de la integridad de las membranas, ofreciendo resultados más fieles y repetibles que otras tinciones de su misma clase.

Estas características hacen que esta tinción posea la suficiente versatilidad para ser propuesta como de elección en los exámenes rutinarios de calidad seminal relacionados con la integridad estructural del acrosoma, tanto en la práctica diaria en los establecimientos productores de dosis de semen porcino destinadas a Inseminación Artificial, como en el laboratorio de Investigación.

2. Métodos de evaluación del estado fisiológico del espermatozoide

En este trabajo se probaron las técnicas de CTC e Ionóforo de calcio A23187 con el fin de detectar, mediante técnicas microscópicas, las modificaciones estructurales de la membrana del espermatozoide como reflejo de cambios en su estado metabólico. Ambas técnicas mostraron ser eficientes en cuanto a su capacidad de diferenciar y mostrar la evolución del proceso de capacitación como consecuencia de la incubación de los espermatozoides de cerdo en medios capacitantes, obteniéndose valores de capacitación que coinciden con los habitualmente hallados en la especie porcina.

3. Rol de glucosaminoglicano heparina sobre la fisiología del espermatozoide porcino

El efecto del glicosaminoglicano sulfatado heparina sobre la capacitación in vitro de espermatozoides porcinos fue evaluado mediante la observación de los patrones de fluorescencia con Clortetraciclina (CTC) y por la habilidad de los

espermatozoides de experimentar una reacción acrosómica luego de la exposición a ionóforo de calcio.

Los espermatozoides incubados durante 120 minutos en condiciones capacitantes (MC) suplementados con 10 µg/ml de heparina mostraron un incremento del número de espermatozoides capacitados (patrón B) y reaccionados sin afectarse su viabilidad, lo que determinó la elección de estas condiciones experimentales para los trabajos siguientes.

Los espermatozoides fueron incubados en MC sin albúmina, calcio o bicarbonato o combinaciones en presencia de heparina. En los medios sin calcio o bicarbonato la capacitación fue basal no mostrando variaciones ante la presencia de heparina. En ausencia de albúmina, la presencia de calcio o bicarbonato estimularon la capacitación, que luego se incrementó con el agregado de heparina. Estos resultados sugieren que la heparina aumenta la capacitación in vitro de los espermatozoides de cerdo sólo en condiciones capacitantes.

4. Naturaleza de la interacción de la heparina con el espermatozoide

Se evaluó la presencia, topología y dinámica de las proteínas de unión a heparina (HBP) en el espermatozoide de cerdo. La distribución de HBP se analizó mediante fraccionamiento subcelular utilizando heparina biotinilada seguida de una detección colorimétrica. Las HBP fueron detectadas como proteínas pertenecientes a la membrana periacrosomal del espermatozoide del tipo periféricas e integrales.

Mediante microscopía de fluorescencia indirecta de espermatozoides incubados con heparina biotinilada se evidenció la unión de heparina al espermatozoide en diferentes estados fisiológicos. Se observaron dos patrones de fluorescencia diferentes (A y B), que probablemente se correspondan con los estados de espermatozoides no capacitados y capacitados, respectivamente; como se estableció mediante la inducción de la reacción acrosómica de espermatozoides capacitados con ionóforo de calcio y la observación del aumento de la fosforilación de la proteína p32.

En el patrón A, predominante en muestras de espermatozoides no tratados, la fluorescencia se localizó en la región posacrosomal; en el patrón B, observado con mayor frecuencia en muestras de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, la fluorescencia ocupó la región acrosomal. Durante la incubación en medio capacitante (TALP), los espermatozoides mostrando el patrón B aumentaron paulatinamente comparados con espermatozoides no incubados o incubados en condiciones no capacitantes indicando que las modificaciones de los patrones de fluorescencia de HBP están probablemente relacionados con la capacitación.

Cuando los espermatozoides fueron incubados con 100 µg/ml de heparina biotinilada en presencia o ausencia de heparina no marcada se observó que los sitios de unión a heparina se localizaron principalmente en la región acrosomal del espermatozoide de cerdo de manera específica y saturable. El efecto in vitro de la heparina observado en este trabajo indica que este glicosaminoglucano sulfatado, normalmente presente en el tracto reproductivo

femenino podría cumplir un rol importante en el proceso de fecundación en porcinos.

No se observaron diferencias cuando espermatozoides no tratados fueron permeabilizados con metanol o tritón antes de la tinción, lo que indica que las HBP se localizan en la superficie espermática.

El efecto de la heparina sobre la fosforilación en tirosina de proteínas espermáticas por efecto de la capacitación fue también analizado encontrándose una disminución en la fosforilación de la proteína p32 en presencia de heparina. Esto sugiere que el incremento de la capacitación mediado por este glucosaminoglicano podría involucrar un proceso de señalización celular alternativo o ser el resultado de la pérdida de estas proteínas por efecto de la RA, hecho que se observa aumentado con el agregado de heparina en los medios de incubación.

El hallazgo de que la heparina se une al espermatozoide en forma diferencial de acuerdo con su estado fisiológico es una nueva evidencia de la remodelación de la superficie de la membrana por efecto de la capacitación y podría proveer un método útil y relativamente simple para la evaluación in vitro de las modificaciones del estado fisiológico del espermatozoide porcino.

5. Caracterización del rol de la heparina en la unión del espermatozoide a la Zona Pelúcida.

Con el fin de evidenciar el efecto de la heparina sobre la unión de los espermatozoides a ZP se utilizó el método del cubreobjetos cubierto de ZP. Al

adicionar espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes y en presencia de heparina a los cubreobjetos, el número de espermatozoides unidos fue significativamente menor comparado con aquellos incubados en ausencia de heparina. En los cubreobjetos no tratados, el número de espermatozoides unidos fue mínimo y no varió significativamente a lo largo de todo el proceso de incubación, independientemente de la presencia de heparina. Este resultado se podría explicar considerando el hecho de que la ZP contiene cierto número de dominios polisulfatados que posiblemente competirían con la heparina.

La mayoría de las HBP permanecen unidas al espermatozoide después de la capacitación, interviniendo algunas de ellas, como AWN-1 y DQH, en la unión primaria del espermatozoide a la ZP y es a estas proteínas a las que se uniría la heparina, hecho que sugiere que los glucosaminoglicanos de su tipo presentes en el tracto femenino podrían estar implicados en la preselección espermática y así contribuir a la prevención de la polispermia.

6. Las HBP como indicadoras de fecundidad en verracos

En este trabajo se procedió a la detección de posibles diferencias en la unión a heparina de muestras de espermatozoides de animales con diferentes grados de fecundidad in vivo. Se procedió a clasificar inicialmente a un grupo de reproductores porcinos, cuyos parámetros de calidad seminal no mostraban diferencias en relación con los valores habituales de normalidad preestablecidos para la especie porcina, en dos grupos (I y II) en función de diferencias en cuanto a su Tasa de Parto (hembras paridas/hembras inseminadas), perteneciendo al grupo I los individuos con una tasa de

fecundidad mayor o igual al 70 % y al grupo II, individuos con una tasa menor al 70 %. Muestras de semen de cada individuo fueron evaluadas mediante microscopía de fluorescencia indirecta utilizando la técnica de incubación de espermatozoides previamente incubados en condiciones capacitantes, con heparina biotinilada y revelado con streptavidina-FITC.

Se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de espermatozoides que muestran patrón B de fluorescencia en 2 animales pertenecientes al grupo II, los que muestran un porcentaje significativamente menor de fluorescencia en la región acrosomal en todos los tiempos de incubación testeados.

Considerando que las HBP AWN-1, AQN-3 y DQH son retenidas en la membrana espermática luego de la capacitación interviniendo como receptores primarios en la unión ovocito-ZP, una disminución en la densidad de estas proteínas sobre la membrana del espermatozoide porcino podría estar reflejada en la disminución en el porcentaje de espermatozoides que unen heparina en la región acrosomal luego de capacitados (patrón B) observada en algunos individuos. En función de los valores de fecundidad inferiores observados para estos mismos animales este resultado estaría identificando, dentro de una población de reproductores aptos para la Inseminación Artificial, una subpoblación de individuos con menor capacidad fecundante (subfecundidad), característica que no se refleja en los análisis comúnmente utilizados para la evaluación de la calidad del semen porcino destinado a la Inseminación Artificial.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se han estudiado diversas técnicas microscópicas para la evaluación de la integridad estructural del acrosoma y el estado fisiológico del espermatozoide de cerdo y se han desarrollado ensayos biológicos y bioquímicos con el fin de caracterizar el rol del glucosaminoglicano sulfatado heparina en el proceso de fecundación y la localización y función de las proteínas de unión a heparina (HBP) en la membrana espermática.

Las conclusiones surgidas a partir de los estudios realizados fueron:

- La tinción Wells & Awa muestra sensibilidad semejante a otras técnicas estandarizadas en la especie porcina en cuanto a su capacidad de detectar alteraciones acrosomales, siendo además de fácil implementación, lo que la posicionan como de elección en estudios de calidad seminal de rutina y en el laboratorio de investigación.
- De acuerdo con los valores obtenidos mediante CTC o el inductor de RA ionóforo de calcio A23187, el glucosaminoglicano sulfatado heparina aumenta los valores de capacitación de los espermatozoides porcinos al ser incubados en condiciones capacitantes.

- La heparina disminuye la señal de fosforilación en tirosina de la proteína p32. Esta observación podría sugerir que la capacitación mediada por heparina involucra una vía de señalización celular diferente o la pérdida de estas proteínas fosforiladas como consecuencia de la RA cuyos valores se vieron aumentados en presencia de heparina.
- La heparina se une en forma específica y competitiva al espermatozoide de cerdo y los sitios de unión a heparina corresponden a proteínas localizadas en la membrana del espermatozoide (HBP) que interactúan con la misma a modo de proteínas integrales y periféricas.
- La unión de la heparina al espermatozoide genera patrones de fluorescencia diferentes según el estado fisiológico del mismo, lo que sugiere que las HBP se modifican en cuanto a su localización y/o disponibilidad durante la capacitación. Como consecuencia de ello, este trabajo presenta una nueva evidencia de la remodelación de la membrana del espermatozoide durante el proceso de capacitación.
- Los cambios en los patrones de tinción fluorescente observados como reflejo de modificaciones de los sitios de unión a heparina durante la capacitación, podrían ser de utilidad en el desarrollo de una nueva técnica de evaluación de la capacitación de espermatozoides porcinos.

- La unión de los espermatozoides capacitados a ZP es inhibida por la presencia de heparina, por lo que este glucosaminoglicano competiría con la ZP por los sitios de unión primaria del espermatozoide a la misma, reflejando su rol en la selección espermática, contribuyendo a evitar la polispermia.
- En animales seleccionados por sus diferencias en cuanto a Fecundidad in Vivo (hembras paridas/hembras inseminadas), el patrón B de fluorescencia con heparina se mostró inferior en algunos individuos del grupo de menor fecundidad. Esto podría reflejar la menor densidad de HBP en los espermatozoides de estos animales mostrando una subfecundidad de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguas AP y Pinto da Silva P. (1985). The acrosomal membrane of boar sperm: a Golgi-derived membrane poor in glycoconjugates. *J Cell Biol.* 100: 528-534.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994). *Germ Cells and Fertilization*. En: *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.
- Allard EK, Blanchard KT, Bockelheide K. (1996). Exogenous stem cell factor (SCF) compensates for altered endogenous SCF expression in 2,5- hexanedione-induced testicular atrophy in rats. *Biol Reprod.* 55: 185-193.
- Allison AC y Hartree EF. (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil.* 21: 501-515.
- Althouse, G.C. (1997). Evaluating Porcine Semen for Artificial Insemination. Standard Test. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 19 (suppl.): 30-35.
- Anastasiadis PZ y Reynolds AB. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signalling and cancer. *J Cell Sci.* 113: 1319-1334.
- Ashdown. (1990). Anatomía del aparato reproductor masculino. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, E. S. Hafez, 5ª edición. Ed. Panamericana, p: 19-37.
- Austin CR. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res.* 4: 581-596.
- Austin CR. (1952). The “capacitation” of the mammalian sperm. *Nature.* 170: 326.
- Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K. (1989). Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J Biol Chem.* 264: 11920-11927.
- Baba T, Niida Y, Michikawa Y, Kashiwabara S, Kodaira K, Takenaka M, Kohno N, Gertong G, Arai Y. (1994). An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate. *J Biol Chem.* 269 (13): 10133-10140.
- Bailey J, Tardif S, Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Lefièvre L, Leclerc P. (2005). Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm kinase activity and capacitation. *Theriogenology.* 63: 599-614.

- Baldi E, Casana R, Falsetti C. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.* 12: 323-330.
- Nicander L y Bane A. (1966). Fine structure of the sperm head in some mammals, with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 4: 496-515.
- Bedford JM. (1970). Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biol Reprod.* 2: 128-158.
- Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. (1988). Fertility-Associated Antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci.* 76: 2032-2039.
- Bellin ME, Hawkins, HE, Oyarzo JN, Vanderboom RJ, Ax R.L. (1996). Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J Anim Sci.* 74: 173-182.
- Berger T, Turner DO, Meizel S, Hedrick JL. (1989). The zona pellucida induced acrosomic reaction in boar sperm. *Biol Reprod.* 40: 525-30.
- Bergqvist AS y Rodríguez-Martínez H. (2006). Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Anim Reprod Sci.* 93 (1–2): 46-60.
- Boatman DE y Robbins RS. (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod.* 44: 806-813.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. (2007). A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology.* 68 (Suppl 1): 147-155.
- Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, Gadella BM. (2008). Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology.* 70 (8): 1188-96.
- Breitbart H y Naor Z. (1999). Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod.* 4: 151-159.
- Brown MT y Cooper JA. (1996). Regulation, substrates and functions of Src. *Biochem Biophys Acta.* 1287: 121-149.
- Brüssow P, Torner H, Ratky J, Manabe N, Tuchscherer A. (2006). Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complex on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir. *J Reprod Dev.* 52 (2): 249-257.

- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Raida M, Sanz L, Töpfer-Petersen E. (1995a). Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modification, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS Lett.* 365: 179-182.
- Calvete JJ, Sanz L, Dostàlovà Z, Töpfer-Petersen E. (1995b). Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. *Fertilität.* 11: 35-40.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. (1996). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol.* 180: 284-296.
- Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA. (2003). Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. *Biol Reprod.* 69: 640-646.
- Chacarov EL y Mollova MV. (1976). A one-act differential stain of the acrosome with active dyes. *Reprod Fertil.* 48: 245-46.
- Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard M, Sullivan R, Bailey J. (2001). The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology.* 55: 823-835.
- Chang MC. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* 168: 697-698.
- Cheng C y Mruk D. (2002). Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. *Physiol Rev.* 82: 825–874.
- Christensen P, Withfield CH, Parkinson TJ. (1996). In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology.* 45 (6):1201-1210.
- Christensen P, Knudsen DB, Wachmann H, Madsen MT. (2004). Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. *Theriogenology.* 62: 1218-1228.
- Christensen P, Hansen C, Liboriussen T, Lehn-Jensen H. (2005). Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs. *Anim Reprod Sci.* 85: 201-208.
- Clark LK, Schinckel AP, Singleton WL, Einstein ME, Teclaw RF. (1989). Use of farrowing rate as a measure of fertility of boars. *J Am Vet Med Assoc.* 194 (2): 239-243.

- Cooper T. (2007).Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. Asian J Androl. 9 (4): 533-539.
- Córdova-Izquierdo A, Córdova-Jiménez CA, Córdova-Jiménez, MS. (2007). Control reproductivo del verraco. Rev Vet. 18 (1): 65-69.
- Cross NL, Morales P, Overstreet BW, Hanson FW. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res. 15 (2): 3-26.
- Cross NL y Meizel S. (1989). Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. Biol Reprod. 41 (4): 635-641.
- Cross NL, Morales P, Fukuda M, Bchboodi E. (1989). Determining acrosomal status of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. Am J Primatol. 17:157-63.
- Cross N. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol Reprod. 59: 7-11.
- Cross N. (2004). Reorganization of lipid raft during capacitation of human sperm. Biol Reprod. 71: 1367-1373.
- Dapino D, Marini P, Cabada M. (2006). Effect of heparin on in vitro capacitation of boar sperm. Biol Res. 39 (4): 631-639.
- Dapino D, Teijeiro J M, Cabada M, Marini P. (2009). Dynamics of heparin-binding proteins on boar sperm. Anim Reprod Sci. 116: 308-317.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. (1999). Ion channels in sperm physiology. Physiol Rev. 79 (2):481-510.
- De Andrade AF, de Arruda RP, Celeghini EC, Nascimento J, Martins SM, Raphael CF, Moretti AS. (2007). Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. Reprod Domest Anim. 42 (2): 190-194.
- Debbage PL, Lange W, Hellmann T, Gabius HJ. (1988). Receptors for sulphated polysaccharides in human placenta. J Histochem Cytochem. 36: 1097-1102.
- De Jonge C. (2005). Biological basis for human capacitation. Hum Reprod Update. (3):205-14.
- De Rooij D y Russel L. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl. 776-798.

- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles JR, Graves CN. (1989). Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 22: 51-57.
- Dostal J y Veselsky L. (1972). Proteins in the seminal plasma and the accessory sexual glands fluids of the boar. *J Reprod Fertil.* 30: 255-267.
- Dostalová Z, Calvete J, Sanz L, Töpfer-Petersen E. (1995). Boar spermadhesin AWN-1 Oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Eur J Biochem.* 230: 329-336.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1200: 48-54.
- Dubé C, Tardif S, Leclerc P, Bailey JL. (2003). The Importance of Calcium in the Appearance of p32, a Boar Sperm Tyrosine Phosphoprotein, During In Vitro Capacitation. *J Androl.* 24 (5): 727-733.
- Dubé C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL. (2005). The Proacrosin Binding Protein, sp32, Is Tyrosine Phosphorylated During Capacitation of Pig Sperm. *J Androl.* 26 (4): 519-528.
- Dumbar B y Raynor D. (1980). Characterization of porcine zona pellucida antigens. *Biol Reprod.* 22: 941-954.
- Eddy E M y O'Brien D A. (1994). The spermatozoon. En: *The physiology of reproduction*. Editado por E. Knobil y J D Neil, Raven Press, New York. p: 29-77.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoolova M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. (2005). Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod.* 73: 536-545.
- Endo Y, Lee MA, Kopf GS. (1988). Characterization of an islet-activating sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida induced acrosome reaction. *Dev Biol.* 129:12-24.
- Fazeli A, Duncan A, Watson P, Holt W. (1999). Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod.* 60(4): 879-886.
- Flesch F, Colenbrander B, Van Golde L, Gadella BM. (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 262: 787-792.

- Flesch F, Brouwers J, Nievelstein P, Verkleij A, Van Golde L, Colenbrander B, Gadella B. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* 114: 3543-3555.
- Flores-Alonso JC, Lezama-Monfil L, Sánchez-Vázquez ML, Reyes R, Delgado NM. (2008). Heparin effect on in vitro nuclear maturation of bovine oocytes. *Zygote.* 16 (1): 1-8.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Dom Anim.* 39: 3003-308.
- Gadella BM, Lopes-Cardozo M, van Golde ML, Colenbrander B, Gadella TW. (1995). Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J Cell Sci.* 108: 935-945.
- Gadella BM y Van Gestel RA. (2004). Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci.* 82 (83): 307-319.
- Gadella B, Tsai P, Boerke A, Brewis I. (2008). Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol.* 52: 473-480.
- Galantino-Homer H, Visconti PE, Kopf GS. (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 56:707-719.
- Garner D y Hafez E. (1990). Espermatozoides y plasma seminal. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, E. S. Hafez, 5ª edición. Ed. Panamericana, p: 206-226.
- Garner DL y Easton MP. (1977). Immunofluorescent localization of acrosin in mammalian spermatozoa. *J Exp Zool.* 200: 157-162.
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. (2008). Seminal plasma proteins regulate the association of lipids and proteins within detergent-resistant membrane domains of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 78 (5): 921-31.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem.* 271: 3459-3469.
- Green CE y Watson PF. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction.* 122: 889-898.

- Hancock JL. (1957). The morphology of boar spermatozoa. *J R Microsc Soc.* 76 (3): 84-97.
- Harrison R, Ashworth P, Miller N. (1996). Bicarbonate/CO₂ an effector of capacitation induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev.* 45: 378-91.
- Hedrick J y Wardrip N. (1986). Isolation of the zona pellucid and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal Biochem.* 157 (1): 63-70.
- Hunter RHF. (1981). Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil.* 63: 109-117.
- Hunter RHF. (1984). Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil.* 72: 203-211.
- Hunter RHF. (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev.* 44: 417-22.
- Hunter RHF. (2005). The fallopian tube in domestic mammals: how vital is their physiological activity?. *Reprod Nutr Dev.* 45: 281-290.
- Hunter T. (1996). Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Biochem Soc Trans.* 24: 307-327.
- Johansson M, Tienthai P, Rodriguez-Martinez H. (2000). Histochemistry and ultrastructure of the intraluminal mucus in the sperm reservoir of the pig oviduct. *J Reprod Dev.* 46: 183-92.
- Jonáková V, Kraus M, Veselsky L, Cechová D, Bezouska K, Tichá M. (1998). Spermadhesins of the AQN and AWN families DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil.* 114: 25-34.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D. (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J Androl.* 438-444.
- Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. (1998). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev.* 51: 304-314.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. (1993). Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 49: 1202-1207.

- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 351: 117-121.
- Krester DM y Kerr JB. (1994). The cytology of the testis. En: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, p: 1177-1290.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lamoureux F, Baud'Huin M, Duplomb L, Heymann D, Rédini F. (2007). Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*. 29 (8): 758-71.
- Lee MA y Storey BT. (1986). Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs; mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod*. 34: 349-356.
- Lee MA, Trucco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT. (1987). Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril*. 48: 649-58.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275.
- Mann T. (1974). Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fert*. 37: 179-188.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E. (1996). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*. 45 (2): 373-81.
- Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 8 (8): 1165-1178.
- Mburu JN, Rodriguez-Martinez H, Einarsson S. (1997). Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim Reprod Sci*. 47: 137-48.
- Meachem S, Von Schönfeldt V, Schlatt S. (2001). Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction*. 121: 825-834.
- Miller D, Winer M, Ax R. (1990). Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*. 42: 899-915.

- Mitic LL y Anderson JM. (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 60: 121-142.
- Monásková P, Peknicová J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. (2007). Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol.* 74 (1-2): 103-113.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. (2006). Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl.* 27 (4):534-41.
- O'Donnel L, Robertson K, Jones M, Simpson E. (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews.* 22 (3): 289-318.
- Parent S, Lefievre L, Brindle Y, Sullivan R. (1999). Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. *Mol Reprod Dev.* 52: 57-65.
- Parrish J, Susko-Parrish J, Winer M, First N. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 38: 1171-1180.
- Parrish J, Susko-Parrish J, Handrow R, First N. (1989). Effect of sulfated glycoconjugates on capacitation and the acrosome reaction of bovine end hamster spermatozoa. *Gamete Res.* 24: 403-413.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL. (1994). Differences in the role of cyclic adenosine 39,59-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod.* 51: 1099-1108.
- Pelliniemi, LJ. (1975). Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am J Anat.* 144: 89-111.
- Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. (2007). Focus on determinants of male fertility determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction.* 34: 3-17.
- Piehler E, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. (2006). Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation. *Cytometry.* 69: 1062-1070.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. (1972). Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa Incubated before cold shock. *J Anim Sci.* 34: 278-283.
- Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. (1974). Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa during in vitro Aging. *J Anim Sci.* 38: 113-116.

- Richardson RT, Nikolajczyk BS, Abdullah LH, Beavers JC, O'Rand MG. (1991). Localization of rabbit sperm acrosin during the acrosome reaction induced by immobilized zona matrix. *Biol Reprod.* 45: 20-26.
- Robertson SA. (2007). Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci.* 85 (Supl.): 36-44.
- Rodriguez-Boulán E y Nelson WJ. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* 245: 718-725.
- Rodriguez-Martínez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. (1990). Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embriol.* 19: 16-36.
- Rodríguez-Martínez H, Thienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. (2001). Oviduct involvement in sperm capacitation and oocyte development. *Reprod Suppl.* 58: 129-145.
- Rodriguez-Martínez H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reprod Dom Anim.* 38: 312-318.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia, F, Wallgren M, Thienthai P, Johannisson A, Vázquez J, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology.* 63: 514-535.
- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R. (1993). Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol.* 155: 68-74.
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG. (2000). The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci.* 78: 443-448.
- Russel LD, Peterson RN, Hunt W, Strack LE. (1984). Posttesticular Surface Modifications and Contributions of Reproductive Tract Fluids to the Surface Polypeptide Composition of Boar Spermatozoa. *Biol Reprod.* 30: 959-978.
- Saling PM y Storey BT. (1979). Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol.* 83: 544-55.
- Sanchez A y Von Lawzewitsch I. (1984). Desarrollo del cerdo. En: *Lecciones de Embriología Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur, tercera edición, p: 101-144.

- Sánchez-Vazquez ML, Flores-Alonso JC, Merchant-Larios H, Reyes R. (2008). Presence and release of bovine sperm histone H1 during chromatin decondensation by heparin-glutathione. *Syst Biol Reprod Med.* 54 (6): 221-30.
- Sanz L, Calvete J, Mann K, Gabius H-J, Töpfer-Petersen E. (1993). Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol Reprod Dev.* 35: 37-43.
- Setchel, B. (1980). The functional significance of the blood testes barrier. *J Androl.* 1: 3-10.
- Setchel BP, Maddocks S, Brooks DE. (1994). Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd. ed. New York: Raven Press, p: 1063-1175.
- Shapiro BM y Eddy EM. (1980). When sperm meets egg: biochemical mechanisms of gamete interaction. *Int Rev Cytol.* 66: 257-302.
- Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. (1994). En: Knobil E, Neill JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*, 2nd. ed. New York, Raven Press, p: 1365-1434.
- Shi Q-X y Roldan ERS. (1995). Bicarbonate/CO₂ is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod.* 52: 540-546.
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Sanz L, Plendl J. (1995). Immunocytochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine genital tract. *Cell Tissue Res.* 282: 175-179.
- Sprott LR, Harris MD, Forrest DW, Young J, Zhang HM, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL. (2000). Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. *J Anim Sci.* 78: 795-798.
- Strzeżek J. (2002). Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol.* 2 (3): 243-266.
- Strzeżek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklińska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L. (2005). Proteomics of boar seminal plasma: current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol.* 5 (3): 279-290.
- Suarez S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Dom Anim.* 37: 140-143.
- Suarez S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol.* 52: 455-462.

- Sutton K. (2000). Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells. *Rev Reprod.* 5: 93-98.
- Talevi R y Gualtieri R. (2001). Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod.* 64: 491-498.
- Tardif S, Sirard M, Sullivan R, Bailey JL. (1999). Identification of capacitation associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated with ATP- γ - ^{32}P . *Mol Reprod Dev.* 54 (3): 292-302.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey J. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 65 (3): 784-792.
- Tardif S, Dubé C, Bailey J. (2003). Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod.* 68: 207-213.
- Tatemoto H, Muto N, Yim SD, Nakada T. (2005). Anti-hyaluronidase oligosaccharide derived from chondroitin sulfate effectively reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 72 (1): 127-34.
- Taylor NJ. (1982). Eosin-fast green as a rapid stain for air dried mammalian spermatozoa. *Stain Technol.* 57: 249-251.
- Thienthai P, Kjellén L, Pertoft H, Suzuki K, Rodríguez-Martínez H. (2000). Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev.* 12: 173-182.
- Thienthai P, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. (2004). Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sc.* 80: 131-146.
- Töpfer-Petersen E y Calvete JJ. (1996). Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules-structure-function correlations of boar spermadhesins. *J Reprod Fertil.* 50: 55-61.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L, Calvete JJ. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia.* 30: 217-224.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoleva M. (2008). Glycobiology of fertilization in the pig. *Int J Dev Biol.* 52: 717-736.

- Turner T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl.* 29 (3): 238-250.
- Vadnais ML, Galantino-Homer HL, Althouse GC. (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl.* 53 (3): 109-123.
- Valencia A, Wens M, Merchant H, Reyes R, Delgado N. (1984). Capacitation of human spermatozoa by heparin. *Arch Androl.* 12: 109-113.
- Van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod.* 11 (8): 583-590.
- Van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. (2007). Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol Hum Reprod.* 13: 445-454.
- Varner DD, Ward CR, Storey BT, Kenney RM. (1987). Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. *Am J Vet Res.* 48: 1383-1389.
- Vázquez JM, Martínez E, Martínez P, García-Artiga C, Roca J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology.* 47 (4): 913-922.
- Viring S y Einarsson S. (1981). Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. *Nord Vet Med.* 33: 145-149.
- Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. (1990). Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochem Biophys Acta.* 1054: 231-236.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121: 1129-1137.
- Visconti P, Galantino-Homer H, Moore G, Bailey J, Ning X, Fornes M, Kopf G. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl.* 19 (2): 242-248.
- Visconti P y Kopf G. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 59: 1-6.
- Waberski D, Südhoff H, Hahn T, Jungblut PW, Kallweit E, Calvete JJ, Ensslin M, Hoppen H-O, Wintergalen N, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. (1995). Advanced

ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil.* 105: 247-252.

Waites GMH, Speight AC, Jenkins N. (1985). The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *J Reprod Fert.* 75: 317-326.

Walker WH y Cheng J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.* 130: 15-28.

Wang W, Abeydeera L, Fraser L, Niwa K. (1995). Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated spermatozoa incubated in a protein free chemically defined medium. *J Reprod Fertil.* 104: 305-312.

Wells, ME y Awa OA. (1970). New Technique for Assessing Acrosomal Characteristics of Spermatozoa. *J Dairy Sc.* 53 (2): 227-32.

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 87: 1-28.

Wine RN y Chapin RE. (1999). Adhesion and signalling proteins spatiotemporally associated with spermiation in the rat. *J Androl.* 20: 198-213.

Wong E, Mruk D, Cheng C. (2008). Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim Biophys Acta.* 1778 (3): 692-708.

Yanagimachi R. (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *J Reprod Fertil Suppl.* 38: 27-33.

Yanagimachi R, Knobil E, Neill JD. (1994). Mammalian Fertilization. En: *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, Ltd, New York, p: 189-317.

Yang WC, Kwok SCM, Leshin S, Bollo E, Li WI. (1998). Purified porcine seminal plasma protein enhances in vitro immune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol Reprod.* 59: 202-207.